

**Einfluss von Hypoxie auf das Transkriptom
und das mitochondriale Proteom von
*Arabidopsis thaliana***

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

vorgelegt von
Claudia Willeke
Kiel 2011

Referent/in: Prof. Dr. Frank Kempken

Korreferent/in: Prof. Dr. Margret Sauter

Tag der mündlichen Prüfung: 02.12.2011

Zum Druck genehmigt:

Kiel,

Der Dekan

meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
1 Einleitung	1
1.1 Einführung	1
1.2 Hypoxie	4
1.2.1 Natürliches Auftreten von Hypoxie und ihre Auswirkung auf aerobe Organismen	4
1.2.2 Wahrnehmung von Hypoxie durch Tiere.....	4
1.2.3 Mögliche Wahrnehmung von Hypoxie durch Pflanzen	7
1.3 Kommunikation zwischen Nukleus und Organellen	11
1.3.1 Lokalisation von mitochondrialen und plastidären Genen	11
1.3.2 Anterograde Regulierung	12
1.3.3 Retrograde Regulierung	15
1.4 Problemstellung	19
2 Material und Methoden	21
2.1 Material	21
2.1.1 Organismen	21
2.1.2 Oligonukleotide	22
2.1.3 Plasmide	29
2.1.4 Membranen und Filter	31
2.1.5 Chemikalien	31
2.1.6 Enzyme	32
2.1.7 Kits	32
2.1.8 Puffer und Lösungen	33
2.1.9 Nährmedien	36
2.2 Methoden	37
2.2.1 Kultur- und Anzuchtbedingungen	37
2.2.1.1 <i>Escherichia coli</i>	37
2.2.1.2 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	37
2.2.1.3 <i>Arabidopsis thaliana</i> -Zellkulturen	37
2.2.1.4 <i>Arabidopsis thaliana</i> -Pflanzen	37

2.2.1.5	<i>Arabidopsis thaliana</i> -Keimlinge und putative Transformanten	37
2.2.2	Durchführung der Hypoxieversuche	38
2.2.2.1	Inkubation im Anaerobenzelt	38
2.2.2.2	Flutungsversuche	38
2.2.2.3	Begasung durch N ₂	38
2.2.3	Isolierung von Mitochondrien und Protoplasten	39
2.2.3.1	Isolierung von Mitochondrien aus <i>Arabidopsis thaliana</i> -Zellkulturen und <i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	39
2.2.3.2	Isolierung von Protoplasten aus <i>Arabidopsis thaliana</i> -Zellkulturen	39
2.2.4	Herstellung kompetenter Bakterien	40
2.2.4.1	Herstellung elektrokompenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen	40
2.2.4.2	Herstellung chemokompenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen	40
2.2.5	Molekularbiologische Methoden	41
2.2.5.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	41
2.2.5.2	Isolierung von Gesamt-DNA aus Pflanzen und Zellkulturen	41
2.2.5.3	Isolierung von Gesamt-DNA aus Pflanzen („Shorty“-Methode)	42
2.2.5.4	Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzen und Zellkulturen	42
2.2.5.5	Synthese von cDNA aus Gesamt-RNA	43
2.2.5.6	Standard-Polymerasekettenreaktion	43
2.2.5.7	Reverse-Transkription-PCR („OneStep“ RT-PCR)	44
2.2.5.8	Quantitative Real Time PCR	44
2.2.5.9	Gelelektrophorese von DNA	45
2.2.5.10	Gelelektrophorese von RNA	45
2.2.5.11	Gelelution von DNA	46
2.2.5.12	Reinigung von DNA mittels Filterblattdialyse	46
2.2.5.13	Reinigung von DNA mittels Ethanolfällung	46
2.2.5.14	Hydrolyse von DNA	46
2.2.5.15	Dephosphorylierung von DNA	46
2.2.5.16	Ligation von DNA-Fragmenten	46

2.2.5.17	Sequenzierung von DNA	47
2.2.5.18	Erstellung der GUS-Reportergenkonstrukte	47
2.2.5.19	Erstellung der GFP-Fusionskonstrukte	48
2.2.5.20	Elektroporation von <i>Escherichia coli</i> und <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	48
2.2.5.21	Transformation von <i>Escherichia coli</i> mit CaCl ₂	49
2.2.5.22	Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> -Protoplasten mit Polyethylenglykol	49
2.2.5.23	Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> -Pflanzen	50
2.2.6	Methoden zur Proteinanalyse	50
2.2.6.1	Extrahierung von mitochondrialem Gesamtprotein	50
2.2.6.2	Denaturierende Gelelektrophorese von Proteinen	50
2.2.6.3	Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen	51
2.2.6.4	Western Blot	51
2.2.6.5	Detektionsverfahren für die Western Blot-Analyse	51
2.2.6.6	Zweidimensionale Gelelektrophorese von Proteinen	52
2.2.6.7	Probenvorbereitung für MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometrie	52
2.2.7	Histologische und physiologische Methoden	53
2.2.7.1	Färbung von pflanzlichen Mitochondrien	53
2.2.7.2	GUS-Färbung von pflanzlichem Gewebe	53
2.2.7.3	Untersuchung der Stomata	53
2.2.7.4	Untersuchung der Pollenvitalität	53
2.2.8	In dieser Arbeit verwendete Software und Datenbankrecherchen	54
3	Ergebnisse	55
3.1	Sauerstoffverbrauch und Verhalten von <i>Arabidopsis thaliana</i> -Zellkulturen unter Hypoxie	55
3.1.1	Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs von <i>Arabidopsis thaliana</i> -Zellkulturen	55
3.1.2	<i>Arabidopsis thaliana</i> -Zellkulturen bilden bei Zugabe von H ₂ O ₂ vermehrt Sauerstoff	57
3.1.3	Hypoxie beeinflusst Morphologie und Verhalten von Mitochondrien	58

3.2	Expressionsstudien von hypoxieregulierten nukleären Genen mitochondrial lokalisierter Proteine bei <i>Arabidopsis thaliana</i>	59
3.2.1	Beeinflussung der Expression durch Hypoxie und weitere abiotische Stressformen	60
3.2.1.1	Eine Analyse von Microarray-Daten führt zur Identifizierung von 65 hypoxiebeeinflussten nukleären Genen mitochondrialer Proteine	60
3.2.1.2	Eine Analyse mittels quantitativer Real Time PCR führt zur Identifizierung von sieben hypoxiebeeinflussten nukleären Genen mitochondrialer Proteine	60
3.2.1.3	<i>In silico</i> Expressionsstudien im Bezug auf weitere abiotische Stressformen	62
3.2.1.4	Test auf mögliche funktionelle Redundanz von <i>ATHSP26.3-mito</i> , <i>ATHSP23.6-mito</i> und <i>ATHSP22-mito</i>	63
3.2.2	Entwicklungs- und gewebespezifische Expressionsstudien	64
3.2.2.1	<i>In silico</i> Expressionsstudien	64
3.2.2.2	Versuche zur Generierung und Charakterisierung von Promotor:GUS-Pflanzen	65
3.3	Untersuchung einer möglichen Beteiligung von kalziumabhängigen Proteinkinasen an der mitochondrialen retrograden Signaltransduktion bei Hypoxie	67
3.3.1	Identifizierung von hypoxieregulierten kalziumabhängigen Proteinkinasen mittels bioinformatischer Methoden	67
3.3.2	Analyse der Transkription von <i>CPK22</i> , <i>CPK23</i> und <i>CPK25</i> unter hypoxischem Stress mittels quantitativer Real Time PCR	68
3.3.3	<i>In silico</i> Expressionsstudien von <i>CPK22</i> und <i>CPK23</i> im Bezug auf weitere abiotische Stressformen sowie Entwicklungs- und Gewebespezifität	69
3.3.4	Untersuchung der Expression von nukleär kodierten Genen mitochondrial lokalisierter Proteine bei T-DNA-Insertionsmutanten ..	70
3.3.5	Test auf mögliche funktionelle Redundanz von <i>CPK22</i> und <i>CPK23</i> ..	71
3.4	Die Proteine <i>ATHSP26.3-mito</i> , <i>ATIDD14</i> , <i>CML38</i> , <i>PHL</i> , <i>ATHSP23.6-mito</i> und <i>ATHSP22-mito</i> sind mitochondrial lokalisiert, während <i>CPK22</i> cytoplasmatisch lokalisiert ist	73

3.5	Untersuchung des mitochondrialen Proteoms von <i>Arabidopsis thaliana</i>	
	unter Hypoxieeinfluss	77
3.5.1	Eine zweifache Aufreinigung erhöht die Reinheit pflanzlicher Mitochondrien	78
3.5.2	Die Auftrennung des mitochondrialen Gesamtproteins durch zweidimensionale Gelelektrophorese führt zur Identifizierung von 24 hypoxiebeeinflussten Proteinspots	81
3.5.3	Eine Analyse der Proteinspots mittels MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometrie führt zur Identifizierung von elf hypoxiebeeinflussten Proteinen	81
3.5.4	<i>In silico</i> Expressionsstudien der entsprechenden Gene	83
3.5.5	Die mitochondrial lokalisierten Proteine ATSLP-mito und ATGSTF6 sowie die möglicherweise mitochondrial assoziierten Proteine TUA4 und ATPGAM-i-cyto werden auf Transkriptionsebene durch Hypoxie reguliert	84
3.6	Charakterisierung von T-DNA-Insertionsmutanten	
	hypoxiebeeinflusster Gene	86
3.6.1	Identifizierung von T-DNA-Insertionsmutanten	86
3.6.2	Phänotypische Analyse von Keimlingen unter Hypoxieeinfluss	87
3.6.3	Phänotypische Analyse von Pflanzen unter Hypoxieeinfluss	90
	3.6.3.1 Morphologie der Pflanzen während der Anzuchtphase	91
	3.6.3.2 Beobachtungen zur Öffnung der Stomata	91
	3.6.3.3 Morphologie der Pflanzen während der vegetativen Wachstumsphase und beim Übergang zur Blütenbildung	93
	3.6.3.4 Größe und Morphologie ausgewachsener Pflanzen	96
	3.6.3.5 Anzahl an sekundären Infloreszenzen	99
	3.6.3.6 Morphologie der Blüten	100
	3.6.3.7 Vitalitätstest des Pollens	101
	3.6.3.8 Untersuchung der Samenanlagen	103
	3.6.3.9 Auftreten der ersten Schoten	103
	3.6.3.10 Anzahl der Schoten bei beginnender Samenreife und bei Versuchsende	104
	3.6.3.11 Morphologie der Schoten und Samen	106

4 Diskussion	108
4.1 Mögliches Auftreten von <i>Oxidative Bursts</i> bei <i>Arabidopsis thaliana</i> -Zellkulturen unter hypoxischen Bedingungen	109
4.2 Morphologie und Verhalten von Mitochondrien bei Hypoxie	111
4.3 Beeinflussung der Expression von <i>ATHSP26.3-mito</i> , <i>ATHSP23.6-mito</i> , <i>ATHSP22-mito</i> , <i>PHL</i> , <i>CML38</i> , <i>AOX1a</i> und <i>ATIDD14</i> durch Hypoxie	114
4.3.1 Unter hypoxischen Bedingungen heraufregulierte Gene	114
4.3.1.1 <i>ATHSP26.3-mito</i> , <i>ATHSP23.6-mito</i> und <i>ATHSP22-mito</i> (Gene dreier mitochondrialer kleiner Hitzeschockproteine) ..	114
4.3.1.2 <i>AOX1a</i> (Gen der Isoform 1a der Alternativen Oxidase)	116
4.3.1.3 <i>CML38</i> (Gen des calmodulinartigen Proteins CML38)	118
4.3.2 Unter hypoxischen Bedingungen herunterregulierte Gene	120
4.3.2.1 <i>PHL</i> (Gen einer putative Helikase)	120
4.3.2.2 <i>ATIDD14</i> (Indeterminate Domain 14)	122
4.4 Erstellung von GUS-Reportergenkonstrukten für den Nachweis von Hypoxie bei <i>Arabidopsis-thaliana</i> -Pflanzen	124
4.5 Beeinflussung der Expression von <i>CPK22</i> und <i>CPK23</i> durch Hypoxie	125
4.6 Veränderte Expression nukleär kodierter Gene mitochondrial lokalisierter Proteine unter Hypoxie in T-DNA-Insertionsmutanten der Linien <i>cpk22</i> und <i>cpk23</i>	127
4.7 Kein Hinweis auf funktionelle Redundanz bei <i>CPK22</i> und <i>CPK23</i>	128
4.8 Lokalisation der Proteine <i>ATHSP26.3-mito</i> , <i>ATIDD14</i> , <i>CML38</i> , <i>PHL</i> , <i>ATHSP23.6-mito</i> und <i>ATHSP22-mito</i>	129
4.9 Verminderung der plastidären Kontamination durch zweifache Aufreinigung	132
4.10 Identifizierung von elf hypoxiebeeinflussten Proteinen mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese und MALDI-TOF/TOF-Analyse	133
4.10.1 Unter hypoxischen Bedingungen vermehrt vorkommende Proteine ...	133
4.10.1.1 <i>ATSLP-mito</i> (mitochondrial lokalisiertes stomatinartiges Protein)	133
4.10.1.2 <i>ATGSTF6</i> (Glutathion-S-Transferase 6)	135
4.10.1.3 Glykolytische Enzyme	136
4.10.1.4 <i>ATB2</i> (Oxidoreduktase)	137
4.10.1.5 <i>BPA1</i> (Bindungspartner von <i>ACD11</i>)	138

4.10.1.6	MAT2 und MAT3 (S-Adenosylmethioninsynthetasen)	139
4.10.2	Unter hypoxischen Bedingungen vermindert vorkommende Proteine .	140
4.10.2.1	MPP α (α -Untereinheit der mitochondrialen prozessierenden Peptidase)	140
4.10.2.2	TUA2-4 (Tubulin-alpha-2-alpha-4-Kette)	142
4.10.2.3	PDIL2-1 (Proteindisulfidisomerase)	143
4.11	Beeinflussung der Entwicklung und Morphologie von Wildtyp-Pflanzen und T-DNA-Insertionsmutanten durch Hypoxie	144
4.11.1	Verzögerung des vegetativen Wachstums und der Reproduktion von <i>Arabidopsis thaliana</i> durch Hypoxie	144
4.11.2	Entwicklung und Reproduktion von Pflanzen der Linien <i>athsp22-mito</i> und <i>athsp26.3-mito</i>	145
4.11.3	Entwicklung und Reproduktion von Pflanzen der Linien <i>cpk22</i> und <i>cpk23</i>	147
4.11.3.1	Wachstum und Entwicklung	147
4.11.3.2	Mögliche Ursachen für die bei Überflutung geöffneten Stomata von Pflanzen der Linie <i>cpk23</i>	149
4.11.3.3	Möglicher Zusammenhang von Pollenvitalität, Hypoxie und Grad der Blütendeformation	151
4.11.3.4	Reduzierte Samenanzahl	152
4.11.4	Entwicklung und Reproduktion von Pflanzen der Linie <i>atslp-mito</i>	153
5	Zusammenfassung	155
6	Literaturverzeichnis	157
A	Anhang	189

Abkürzungen

<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
CaMV	Blumenkohlmosaikvirus (engl. „Cauliflower Mosaic virus“)
cDNA	komplementäre DNA (engl. „complementary DNA“)
<i>coxII</i>	für die Untereinheit II der Cytochrom-c-Oxidase kodierendes Gen
DEPC	Diethyldicarbonat
<i>dlacZ</i>	für β -Galaktosidase kodierendes Gen
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. „Desoxyribonucleic acid“)
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
fwd	vorwärts (engl. „forward“, Oligonukleotid, welches an den kodogenen Strang der DNA bindet)
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein (engl. „Green Fluorescent Protein“)
GUS	β -Glukuronidase
<i>gusA</i>	für β -Glukuronidase aus <i>E. coli</i> kodierendes Gen (früher <i>uidA</i>)
IPG	Immobilisierter pH-Gradient
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
MES	2-(N-Morpholino)-Ethansulfonsäure
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (engl. „messenger ribonucleic acid“)
MSMO	Murashige & Skoog Minimalmedium
NAA	1-Naphtylelessigsäure
NO	Stickstoffmonoxid (engl. „nitric oxide“)
<i>nptII</i>	für Neomycinphosphotransferase II kodierendes Gen
<i>nptIII</i>	für Neomycinphosphotransferase III kodierendes Gen

PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. „Polymerase Chain Reaction“)
PEG	Polyethylenglykol
pI	Isoelektrischer Punkt
rev	Rückwärts (engl. „reverse“, Oligonukleotid, welches an den komplementären Strang der DNA bindet)
RNA	Ribonukleinsäure (engl. „Ribonucleic acid“)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (engl. „reactive oxygen species“)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. „Rounds per Minute“)
RT	Reverse Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. „Sodium dodecyl sulfate“)
TEMED	Tetramethylethylendiamid
T-DNA	Transfer-DNA
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indoxyl- β -D-Galactopyranosid
X-Gluc	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Glucuronsäure

Allgemein gebräuchliche Abkürzungen und Maßeinheiten sind nicht gesondert aufgeführt

1 Einleitung

1.1 Einführung

In pflanzlichen Zellen ist genetische Information zusätzlich zum Zellkern in den Mitochondrien und den Plastiden lokalisiert. Somit lässt sich das Genom der Pflanze in Kerngenom, Plastom (Genom der Plastiden) und Chondriom (Genom der Mitochondrien) aufteilen. Nach der Endosymbiontentheorie kann die Abstammung sowohl von Mitochondrien als auch von Plastiden auf jeweils einen freilebenden eubakteriellen Vorfahren zurückverfolgt werden (Gray, 1999). Diese anfangs eigenständigen Organismen wurden durch serielle endosymbiontische Ereignisse von einer Wirtszelle aufgenommen. Man nimmt an, dass zuerst die Mitochondrien aus einem α -proteobakteriellen Vorfahren entstanden sind, der entweder von einem Archaeobakterium oder einem ursprünglichen Eukaryonten aufgenommen wurde. Plastiden gingen später aus einem Cyanobakterium hervor, welches von einer schon Mitochondrien enthaltenden eukaryontischen Zelle aufgenommen wurde (Gray, 1999; Osteryoung und Nunnari, 2003).

Bei Plastiden handelt es sich um eine vielseitige Gruppe von Organellen, die hauptsächlich in Pflanzen und einigen Parasiten vorkommen. Neben den photosynthetisch aktiven Chloroplasten gibt es bei Landpflanzen eine Reihe von speziellen Plastiden, wie den Chromoplasten in Früchten und den Amyloplasten in Speicherorganen. Die meisten Plastiden besitzen zwei Hüllmembranen und können sich unter bestimmten Umweltbedingungen oder in besonderen Entwicklungsstadien ineinander umwandeln. Darüber hinaus dienen Proplastiden in meristematischen Zellen als Vorläufer für andere Plastidformen (Inaba und Ito-Inaba, 2010). Komplexere Plastiden, wie sie zum Beispiel bei Eugleniden vorkommen, können auch über drei bis vier Membranen verfügen. Sie sind durch sekundäre oder tertiäre Endosymbiose entstanden (Inaba und Ito-Inaba, 2010; Howe et al., 2008). Neben dem Photosyntheseprozess sind Plastiden an diversen essentiellen metabolischen Funktionen und Signalgebungen beteiligt und somit in der Lage, zahlreiche Aspekte der pflanzlichen Entwicklung und des Wachstums zu beeinflussen. Dazu gehören die Embryogenese, die Blattentwicklung, Gravitropismus, die Reaktion auf Temperaturschwankungen und Interaktionen zwischen Pflanzen und Mikroben (Inaba und Ito-Inaba, 2010).

Mitochondrien verfügen über zwei Hüllmembranen, die durch den sogenannten Intermembranraum voneinander getrennt sind. Die äußere Membran umschließt das gesamte Mitochondrium und ähnelt mit ihrer zur einen Hälfte aus Lipiden und zur anderen Hälfte aus Proteinen bestehenden Zusammensetzung der Membran von gramnegativen Bakterien. Die innere Membran besteht zu zwanzig Prozent aus Lipiden und zu achtzig Prozent aus Proteinen. Ihre Oberfläche ist durch zahlreiche Einstülpungen (Cristae) stark vergrößert. Sie umgibt das ringförmige Chondriom und die Enzyme des Trikarbonsäurezyklus enthaltende mitochondriale Matrix. Mitochondrien sind an vielen Prozessen des Intermediärstoffwechsels wie der Synthese von Hämgruppen, Steroiden, Aminosäuren und Eisen-Schwefel-Clustern beteiligt (Gabaldón und Huynen, 2007). Sie sorgen darüber hinaus für eine Aufnahme und Akkumulierung von Ca^{2+} aus dem Cytosol während physiologischer Ca^{2+} -Signalgebungen (Duchen, 2000). Weiterhin spielen sie eine entscheidende Rolle bei der Auslösung des programmierten Zelltods (Newmeyer und Ferguson-Miller, 2003). Die Hauptaufgabe der Mitochondrien ist jedoch die Produktion von für die Zelle nutzbarer Energie in Form von ATP (Adenosintriphosphat). Dies geschieht durch den Prozess der oxidativen Phosphoryllierung. Bei diesem Vorgang werden aus den im Trikarbonsäurezyklus erzeugten Verbindungen NADH (reduziertes Nikotinamidadenindinukleotid) und FADH_2 (reduziertes Flavinadenindinukleotid) stammende Elektronen über eine Reihe von Trägermolekülen in der inneren Mitochondrienmembran weitergegeben. Am Ende dieser Elektronentransportkette werden die Elektronen von der terminalen Oxidase auf molekularen Sauerstoff übertragen. Durch die Passage der Elektronen entlang der Transportkette entsteht Energie in Form eines die innere Membran überspannenden Protonengradienten, welcher von dem Enzym ATP-Synthase zur Produktion des Energieträgers ATP genutzt wird (Saraste, 1999). Die von Komplex I gelieferten, aus NADPH (reduziertes Nicotinamidadenindinukleotidphosphat) stammenden Elektronen sowie die von Komplex II durch die Oxidation von Succinat bereitgestellten Elektronen werden im Chinonpool gebündelt. Von diesem Punkt aus verzweigen sich die beiden Respirationsmechanismen der mitochondrialen Elektronentransportkette. Der erste Mechanismus verwendet Cytochrom-c-Oxidase (COX) als terminale Oxidase, während bei dem zweiten Mechanismus das Enzym Alternative Oxidase (AOX) diese Funktion übernimmt. Bei dem Cytochrom-c-Oxidase-abhängigen Pfad werden die Elektronen über den Komplex III und das Enzym Cytochrom c auf die Cytochrom-c-Oxidase übertragen und mit molekularem Sauerstoff zu Wasser reduziert. Dabei werden von den Komplexen I und II sowie der Cytochrom-c-Oxidase die zum Aufbau des Gradienten nötigen Protonen in den Intermembranraum gepumpt. Die Alternative Oxidase dagegen

oxidiert Ubichinol direkt ohne Protonen zu pumpen. Die aus dem Elektronenfluss resultierende Energie wird stattdessen als Hitze frei (Rhoads und Subbaiah, 2007). Einige zu den Familien der Aronstabgewächse (*Araceae*), Wasserlilien (*Nymphaeaceae*), Lotosgewächse (*Nelumboaceae*) und Palmengewächsen (*Arecaceae*, *Cyclanthaceae*) gehörende Pflanzen produzieren auf diese Weise aktiv Wärme (Seymour und Schultze-Motel, 1998). Dieser als Thermogenese bezeichnete Vorgang findet vor allem in den Reproduktionsorganen statt und wird für das Verdampfen von flüchtigen, bestäubende Insekten anziehenden Duftstoffen, zum Schutz der Blüten vor Kälteschäden oder für die Reifung des Pollens verwendet (Seymour und Schultze-Motel, 1998; Miller et al., 2010; Sunderhaus et al., 2010).

Vergleicht man die Genome von Mitochondrien und Plastiden mit denen der ursprünglich eigenständigen Organismen, so weisen beide Organellen einen Verlust an genetischer Information auf. Grund dafür ist der sogenannte „endosymbiontische Gentransfer“ (Gray, 1992; Brennicke et al., 1993), durch den im Laufe der Evolution ein Großteil der Gene der aufgenommenen Bakterien entweder verlorengegangen ist oder in den Nukleus transferiert wurde (Gray, 1999). Besonders Gene der Aminosäuresynthese, der Nukleosidbiosynthese, der anaeroben Glykolyse und deren Regulierung wurden mit hoher Wahrscheinlichkeit aus dem Genom der Organellen entfernt, da diese Funktionen von der Wirtszelle übernommen werden konnten (Gray et al., 1999). Von diesen Genen kodierte mitochondrial bzw. plastidär lokalisierte Proteine werden daher im Zellkern transkribiert. Die Synthese erfolgt an cytoplasmatischen Ribosomen, gefolgt von einem posttranslationalen Import in das jeweilige Organell (Braun und Schmitz, 1999; Haucke und Schatz, 1997). Plastom und Chondriom kodieren nur noch für eine beschränkte Anzahl an Proteinen, bei denen es sich hauptsächlich um Komplexe der mitochondrialen Elektronentransportkette, des Photosyntheseapparates und um Komponenten des organellären Transkriptions- und Translationsmechanismus handelt (Giegé et al., 2005; Isono et al., 1997). Metabolismus und genetischer Apparat beider Sorten von Organellen haben bakterielle Eigenschaften bewahrt. Die Koevolution dreier verschiedener Genome (nukleär, mitochondrial, plastidär) resultierte nicht nur in einer Neuverteilung der Gene, sondern auch der Genprodukte (Bohne et al., 2007). Deren Anzahl wird in Mitochondrien und Plastiden dabei durch posttranskriptionelle Prozesse bestimmt (Giegé et al., 2000). Beide Organellen beherbergen ein ähnliches Repertoire an RNA-prozessierenden Signalwegen wie die RNA-Editierung, das Spleißen von Intronen der Gruppe II und die exo- und endonukleolytische Verkürzung der 5'- und 3'-Enden der Primärtranskripte (Prikryl et al., 2008; Binder et al., 1996).

1.2 Hypoxie

1.2.1 Natürliches Auftreten von Hypoxie und ihre Auswirkung auf aerobe Organismen

Die vollständige, vier Elektronen umfassende Reduzierung von molekularem Sauerstoff (O_2) zu Wasser ist eine der wichtigsten Quellen von metabolischer Energie für lebende Organismen. Die zur Aktivierung von O_2 zu überwindenden Energiebarrieren lassen eine enzymatische Kontrolle des Reduktionsvorgangs zu. Daher können relativ hohe Sauerstoffkonzentrationen toleriert werden (Ratcliffe et al., 1998). In Eukaryonten stellt Sauerstoff den finalen Elektronenakzeptor der mitochondrialen Elektronentransportkette dar. Ein Mangel an Sauerstoff hat schnelle und tiefgreifende Konsequenzen für die Zellphysiologie von aeroben Organismen. Durch diesen Zustand wird die Genexpression, der Energieverbrauch, der zellulären Metabolismus sowie Wachstum und Entwicklung des Organismus verändert. Auf natürlichem Weg kann Sauerstoffmangel durch Überflutung, heftige Regenfälle, Umhüllung durch Eis, Untertauchen, Bodenverdichtung und mikrobielle Aktivität entstehen (Bailey-Serres und Chang, 2005). Darüber hinaus tritt Hypoxie bei vertikaler Stratifizierung als natürliches Phänomen in Gewässern auf. Das massive Einbringen von Nährstoffen und organischem Material in Gewässer mit geringer Zirkulation verursacht ebenfalls einen Mangel an Sauerstoff (Wu, 2002). Die Zellen aerober Organismen haben daher Methoden entwickelt, um den durch Sauerstoffmangel hervorgerufenen Energiemangel auszugleichen. Diese Anpassungen auf zellulärem Niveau bis hin zum gesamten Organismus beinhalten Veränderungen des Metabolismus und der Entwicklung, die in manchen Fällen auch eine langfristige Toleranz von Hypoxie ermöglichen. Die Mechanismen, welche der Wahrnehmung von Sauerstoffmangel und der Reaktion darauf zugrunde liegen, sind allerdings bisher bei keinem aeroben Organismus vollständig erforscht (Bailey-Serres und Chang, 2005).

1.2.2 Wahrnehmung von Hypoxie durch Tiere

Tiere reagieren auf Hypoxie, indem sie zuerst versuchen, die Sauerstoffversorgung durch erhöhte Respirationsrate, verstärkte Bildung von roten Blutzellen oder erhöhte Bindekapazität von Hämoglobin aufrecht zu erhalten. Führt dies nicht zum Erfolg, so wird der Metabolismus

heruntergefahren, um Energie zu konservieren. Die Proteinsynthese wird zusammen mit der Produktion bestimmter regulatorischer Enzyme herunterreguliert. Bei andauerndem Sauerstoffmangel ist eventuell ein Zurückgreifen auf anaerobe Respiration notwendig. Hypoxie reduziert außerdem Wachstum und Ernährung, was letztendlich die individuelle Überlebensfähigkeit beeinflusst (Wu, 2002).

Um eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff zu gewährleisten, haben Tiere im Laufe der Evolution spezielle Transportmechanismen entwickelt. Diese erstrecken sich vom makroanatomischen Bereich (Herz, Lunge, Kiemen, Blut) über die mikroskopische Organisation von sauerstoffkonsumierenden Geweben bis hin zur Zonierung der Aktivitäten metabolischer Enzyme sowie der intrazellulären Anordnung von Organellen. Solche Prozesse müssen von Mechanismen zur Sauerstoffwahrnehmung und zur Regulierung der Genexpression abhängig sein (Ratcliffe et al., 1998).

Im klassischen Modell der biologischen Signalgebung bindet ein Ligand stereospezifisch an einen Rezeptor. Das auf diese Weise ausgelöste Signal beeinflusst zelluläre Funktionen entweder direkt oder durch Veränderungen der Genexpression. Die meisten Liganden haben dabei außer der Bindung an den Rezeptor keine weiteren Aufgaben. Im Gegensatz dazu spielt Sauerstoff zusätzlich eine wichtige Rolle bei der metabolischen Respiration. Diese ist der Beteiligung an der Signalgebung über einen Sensor-Rezeptor-Mechanismus übergeordnet (Bunn und Poyton, 1996). Man geht mittlerweile davon aus, dass es sich bei dem Sauerstoffsensor um ein in der Plasmamembran lokalisiertes, aus mehreren Untereinheiten bestehendes Protein handelt. Dieses durchläuft bei Bindung von Sauerstoff eine Konformationsänderung. Diskutiert wird ein Häm-Protein mit zusätzlicher NADPH-Oxidasefunktion (Bunn und Poyton, 1996). Außerdem sind mit hoher Wahrscheinlichkeit reaktive Sauerstoffzwischenprodukte sowie Kobalt und Eisenchelatoren an der Signaltransduktion beteiligt (siehe Abbildung 1.1). Diese interagieren wiederum mit dem hypoxieinduzierten Faktor 1 (HIF1). Dieser bei Fischen und Säugetieren vorkommende heterodimere DNA-bindende Komplex ist aus zwei Helix-Loop-Helix Per-AHR-ARNT-Sim-Proteinen (HIF1- α und HIF1- β) aufgebaut. Die Expression der für HIF1- α und HIF1- β kodierenden Gene wird nicht durch Hypoxie induziert (Brahimi-Horn und Pouyssegur, 2007). Dies weist auf eine Aktivierung von HIF1 durch translationalen und/oder posttranslationalen Mechanismen hin (Ratcliffe et al., 1998). Experimente mit Fusionsproteinen befürworten ein Modell mit zwei Mechanismen zur Aktivierung von HIF1- α . Induzierung und Derepression der zu aktivierenden Domäne werden durch Regulierung der Menge an Transkriptionsfaktoren verstärkt.

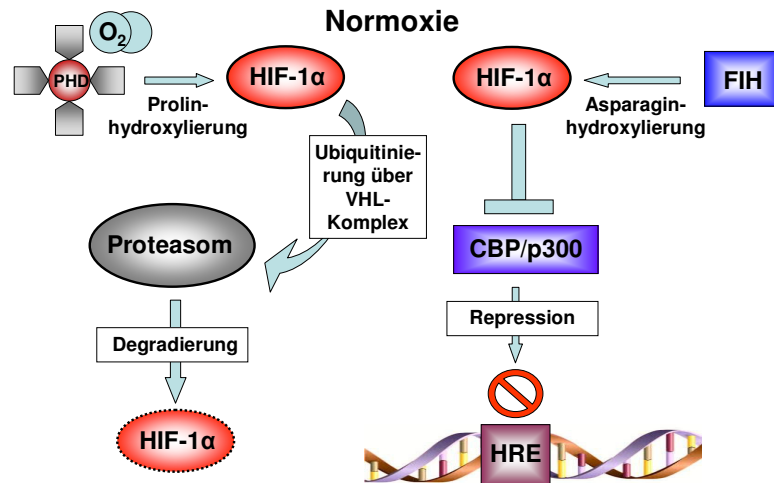


Abbildung 1.1: Mechanismen der sauerstoffabhängigen posttranslationalen Regulierung der Stabilität und Aktivität von HIF-1- α .

Bei Normoxie wird HIF1- α konstitutiv exprimiert, aber sofort durch die Prolylhydroxylase-Domäne des Sauerstoffsensors (PHD) und den HIF1-inhibierenden Faktor (FIH) hydroxyliert. Die Prolinhydroxylierung hat eine Interaktion mit dem von Hippel-Lindau-E3-Ligase-Komplex (VHL-Komplex) zur Folge, die zu einer Ubiquitinisierung und proteasomalen Degradierung führt. Die Asparaginhydroxylierung von HIF1- α verhindert die Interaktion mit den Koaktivatoren CBP/p300 und unterdrückt so die Transkription der Zielgene (verändert nach Brahimi-Horn und Pouyssegur, 2007).

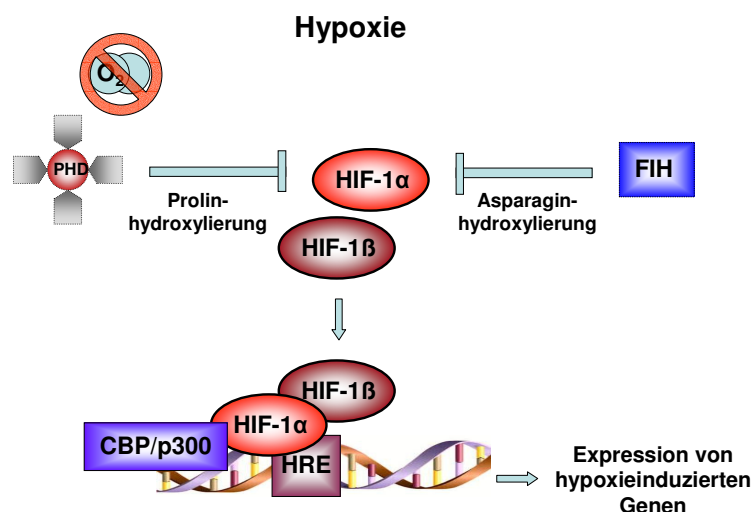


Abbildung 1.2: Aktivierung von HIF1- α bei Hypoxie.

Sauerstoffmangel hemmt die beiden Prolylhydroxylasen. HIF1- α bleibt stabil und assoziiert mit HIF1- β . Das aktive Protein wandert in den Nukleus und bindet an das Hypoxia-Response-Element (HRE). Zusammen mit den Koaktivatoren CBP/p300 aktiviert HIF1 die Expression der Zielgene (verändert nach Brahimi-Horn und Pouyssegur, 2007).

Dieser Mechanismus basiert auf Veränderungen der Proteinstabilität (Pugh et al., 1997). Während die HIF1- β -Untereinheit konstitutiv exprimiert wird, ist die HIF1- α -Untereinheit trotz kontinuierlicher Synthese unter normoxischen Bedingungen instabil und wird über das Ubiquitinproteasomsystem abgebaut (Salceda und Caro, 1997). An diesem Vorgang ist eine sauerstoffabhängige Oxidase beteiligt. Dieses Dioxygenaseprolylhydroxylasedomänen-Protein (PHD) hydroxiliert HIF1- α an zwei Prolinresten und markiert es so für die Erkennung durch den von Hippel-Lindau-Ubiquitin E3-Ligase-Komplex. Die darauffolgende

Ubiquitinierung führt zur Degradierung von HIF1- α durch das 26S-proteasomale System. PHD-Proteine kommen in drei verschiedenen Isoformen vor. Die Expression der Gene von zwei Isoformen wird von HIF und damit durch Hypoxie gesteuert. Durch diese Autoregulierung wird eine schnelle und optimale Degradierung von HIF1- α bei einer Rückkehr der Zelle zur Normoxie garantiert. Der HIF1-inhibierender Faktor (FIH), eine weitere Dioxygenase, hydroxyliert HIF1- α an einem N-terminalen Asparaginrest. Dies verhindert die Bindung von HIF1- α an notwendige Koaktivatoren wie die beiden Histon-Acetyltransferasen CBP (CREB-bindendes Protein) und dessen Paralog p300 (siehe Abbildung 1.1). Auf diese Weise wird die primäre Kontrolle der Aktivität und Stabilität von HIF durch eine doppelte posttranslationale Hydroxylierung gewährleistet (Brahimi-Horn und Pouyssegur, 2007). Unter hypoxischen Bedingungen kommt es zu einer rapiden Akkumulierung von HIF1- α , da die zur Inaktivierung und Degradierung des Proteins notwendigen Hydroxylasen sauerstoffabhängig sind (siehe Abbildung 1.2). HIF1- α ist dann in der Lage, an seinen Partner HIF1- β zu binden. Das aktive HIF-1 wandert in den Nukleus, wo es mit den Koaktivatoren CPB und p300 assoziiert und an das Hypoxia-Response-Element (HRE) bindet (Brahimi-Horn und Pouyssegur, 2007; Trachootham et al., 2008). Diese funktionelle HIF-1-Bindestelle lässt sich in vielen durch Sauerstoff regulierten Promotoren und Enhancern finden (Pugh et al., 1997). Durch diese Kontrollelemente regulierte Gene sind an zahlreichen wichtigen biologischen Prozessen wie Transport und Verstoffwechselung von Glukose, vaskulärem Wachstum, vasomotorische Regulierung, Erythropoiese, Eisenstoffwechsel und Katecholaminsynthese beteiligt (Bunn und Poyton, 1996).

1.2.3 Mögliche Wahrnehmung von Hypoxie durch Pflanzen

Fast alle Pflanzen erfahren während ihres Wachstums und ihrer Entwicklung Hypoxie, da die Diffusion von Gasen in Geweben mit dicht gepackten Zellen nur sehr langsam ablaufen kann (Rhoads und Subbaiah, 2007). Während der Quellung von Samen, ihrer Auskeimung, der Mikrosporenproduktion oder der Fruchtentwicklung kann die Verfügbarkeit von Sauerstoff zur Energiegewinnung ebenfalls eingeschränkt sein (Bailey-Serres und Chang, 2005). Sauerstoff ist darüber hinaus ein limitierender Faktor für die Vegetation in häufig überfluteten Gegenden. Aus diesem Grund zeigen sogar Landpflanzen beträchtliche Toleranz gegenüber Sauerstoffmangel. So werden bei Überflutung Aerenchyme gebildet, durch die Sauerstoff und das für die Photosynthese essentielle CO₂ in die überfluteten Bereiche hineindiffundieren

können. Diese Art der Anpassung funktioniert allerdings nur bei einer teilweisen Überflutung. Ist die Pflanze komplett von Wasser bedeckt, kommt es zu einem Mangel an photosynthetischen Produkten, kombiniert mit einer Inhibierung der aeroben Respiration durch fehlende Sauerstoffversorgung. Dies führt früher oder später zu einem Energiemangel, welche den Ablauf der Zellfunktionen gefährdet und eine möglicherweise fatale cytoplasmatische Azidose hervorrufen kann (Jackson, 2008). Verstärktes Längenwachstum, Bildung von sprossbürtigen Wurzeln (Lorbiecke und Sauter, 1999) und verbesserte Photosynthesefähigkeit durch neue, unter Wasser gebildete Blätter mit veränderter interner Anatomie und Blattform (Mommer und Visser, 2005) sind daher weitere Methoden, mit denen Pflanzen versuchen, dem drohenden Sauerstoffmangel zu entkommen.

Dies weist darauf hin, dass während der Evolution Systeme zur Wahrnehmung von Sauerstoffmangel sowie robuste, darauf ansprechende Signalwege erworben wurden, die der Pflanze eine Anpassung an die veränderten Umweltbedingungen erlauben (Rhoads und Subbaiah, 2007). Anders als bei Tieren und Menschen konnte ein direkter Sauerstoffsensor bei Pflanzen bislang nicht charakterisiert werden. Es gibt allerdings Beweise für eine indirekte Wahrnehmung von Sauerstoff, die auf Veränderungen der zellulären Homöostase basiert (Bailey-Serres und Chang, 2005). Da Sauerstoff in der Zelle hauptsächlich als finaler Elektronenakzeptor der mitochondrialen Atmungskette benötigt wird, liegt die Vermutung nahe, dass Schwankungen in der Sauerstoffkonzentration zuerst in diesen Organellen wahrgenommen werden.

Anaerober Stress führt zu destruktiven, degradativen und adaptiven Umgestaltungen der mitochondrialen Membranen. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass Mitochondrien unter Normoxie eine runde bis ovale Form besitzen und viele Cristae sowie eine dichtgepackte Matrix aufweisen. Bei anoxischen Bedingungen treten Schwellungen auf, die Anzahl der Cristae verringert sich und es kommt zu einer graduellen Klärung der Matrix (Vartapetian et al., 2003). Bei Absenkung der verfügbaren Sauerstoffkonzentration unter den halben Sättigungswert der terminalen Oxidase wird die normale mitochondriale Respiration funktionell eingestellt (Igamberdiev et al., 2005). Diese Veränderungen sind reversibel bei einer Rückkehr zu normoxischen Bedingungen. Eine irreversible Degradierung der mitochondrialen Ultrastruktur tritt erst bei längerfristiger Anoxie auf (Vartapetian et al., 2003). Des Weiteren wurde bei Anoxie eine Anpassung der mitochondrialen Enzymzusammensetzung beobachtet, deren Muster dem des Wechsels vom kompletten zum partiellen Trikarbonsäurezyklus ähnelt. Diese modifizierte Version des Trikarbonsäurezyklus arbeitet mit einer höheren Reduktionsrate (Igamberdiev und Gardeström, 2003).

Mitochondrien bewahren ihre Ultrastruktur und Funktion bei Anoxie nur, wenn die Pflanze unter diesen Bedingungen Nitrat aufnehmen kann (Vartapetian et al., 2003). Aufgrund des vermehrten Vorkommens von Nitratreduktase bei hypoxischen Bedingungen wäre Nitrat als Teil eines ausgeprägteren Zyklus zu betrachten, bei dem Nitrit als intermediärer Elektronenakzeptor durch Unterstützung der NADH-Oxidation in Frage kommt (Botrel et al., 1995; Igamberdiev und Hill, 2004). Somit bewahren Mitochondrien auch unter hypoxischen Bedingungen ihre Fähigkeit zur Oxidation von externem NADH, NADPH und von Substraten des Trikarbonsäurezyklus (Igamberdiev und Hill, 2009). Stickstoffmonoxid (NO) scheint ebenfalls eine Rolle bei der Wahrnehmung von Sauerstoff zu spielen. Dieses gasförmige freie Radikal ist empfindlich gegenüber molekularem Sauerstoff und beeinflusst bei Säugetieren Blutdruck und Sauerstoffverbrauch. In Pflanzen ist Stickstoffmonoxid an verschiedenen physiologischen Aspekten wie der Pflanzen-Pathogen-Interaktion, dem programmierten Zelltod und der Signalgebung beteiligt (Delledone et al., 1998; Yamasaki et al., 2001; Wang et al., 2010; Wilkinson und Davies, 2010). In den Mitochondrien beeinflusst dieses Molekül diverse Enzyme des Trikarbonsäurezyklus und der Elektronentransportkette wie zum Beispiel Aconitase, die Cytochrom-c-Oxidase und die Alternative Oxidase (Blokhina und Fagerstedt, 2010). Eine Synthese erfolgt in den Mitochondrien entweder aus der Aminosäure Arginin durch Stickstoffmonoxidsynthase (Guo und Crawford, 2005) oder bei Hypoxie aus Nitrit unter Beteiligung der mitochondrialen Elektronentransportkette (Planchet et al., 2005). Cytochrom-c-Oxidase kann unter normoxischen Bedingungen Stickstoffmonoxid in Nitrit umwandeln (Cooper, 2002; Pearce et al., 2002). Bei sinkender Sauerstoffkonzentration kehrt sich dieser Vorgang um, so dass Nitrit zur Quelle von NO wird (Paitian et al., 1985). Bei Hypoxie reduziert Stickstoffmonoxid den Sauerstoffverbrauch der Zelle, indem es die mitochondriale Respiration durch kompetitive Bindung mit Sauerstoff an der Cytochrom-c-Oxidase reversibel inhibiert (Brown, 1995). Dies hat eine Verringerung der biosynthetischen Aktivität und der Verfügbarkeit von ATP zur Folge, verhindert aber eine komplette Anoxie (Igamberdiev und Hill, 2009). Eine Rückkehr zur Normoxie reduziert die Konzentration an NO, so dass die Inhibierung der mitochondrialen Respiration aufgehoben wird (Borisjuk et al., 2007). Die Regulierung dieses Vorgangs wird vermutlich von einem pflanzlichen, nichtsymbiontischen Hämoglobin der Klasse I übernommen (Borisjuk et al., 2007). Dieses wird durch Hypoxie sowie einer Unterbrechung der ATP-Synthese induziert (Taylor et al., 1994; Nie und Hill, 1997). Es besitzt NO-Deoxygenaseaktivität und kann dank seiner hohen Affinität für Sauerstoff selbst bei geringen O₂-Konzentrationen unter Verbrauch von NADPH Stickstoffmonoxid in Nitrat umwandeln (Borisjuk et al., 2007; Hebelstrup et al., 2007).

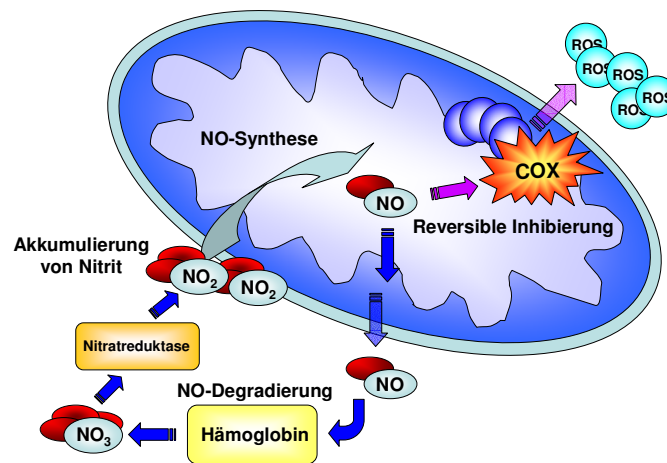


Abbildung 1.3: Modell für den NO-Zyklus und die Sauerstoffwahrnehmung bei Pflanzen.

Unter hypoxischen Bedingungen wird Nitrit akkumuliert. Dieses wird in den Mitochondrien zu NO umgewandelt. NO ist bei Hypoxie stabil, inhibiert COX reversibel und kann so Bildung und Ausstoß von möglicherweise als Signalmoleküle agierenden ROS veranlassen. Wegen seiner geringen Größe kann NO aus den Mitochondrien herausdiffundieren und wird im Cytosol von den Hämoglobinen in Nitrat umgewandelt. Durch Beteiligung der Nitratreduktase entsteht aus Nitrat wieder Nitrit (verändert nach Borisjuk et al., 2008).

Man geht davon aus, dass die Hämoglobine im Cytosol rund um die Mitochondrien lokalisiert sind und als Entgifter des aus den Mitochondrien herausdiffundierenden NO agieren (Hebelstrup et al., 2007; Borisjuk et al., 2008). Ein mögliches Modell für die Sauerstoffwahrnehmung bei Pflanzen durch Stickstoffmonoxid könnte deshalb so aussehen: Unter hypoxischen Bedingungen wird von Nitrit akkumuliert, welches als alternativer Elektronenakzeptor der Cytochrom-c-Oxidase unter möglicher Involvement des Komplex III und der alternativen Oxidase Verwendung findet (Igamberdiev und Hill, 2009). Darüber hinaus dient Nitrit als Grundlage für die Synthese von NO. Hypoxie erhöht die Stabilität von Stickstoffmonoxid, welches die mitochondriale Atmungskette durch kompetitive Bindung der Cytochrom-c-Oxidase hemmt. Aufgrund seiner geringen Größe kann NO leicht aus den Mitochondrien hinaus in das Cytosol diffundieren, wo es von den Hämoglobinen in Nitrat umgewandelt wird. Wegen ihrer hohen Affinität für Sauerstoff sind die Hämoglobine selbst bei einer geringen O_2 -Konzentration noch aktiv. Dadurch kommt es zur Ausformung eines NO-Konzentrationsgradienten von den Mitochondrien in Richtung Cytosol (siehe Abbildung 1.3). Bei Reoxygenierung erhöht sich die Sauerstoffkonzentration in den Mitochondrien, so dass NO von der Bindestelle der Cytochrom-c-Oxidase verdrängt und die Inhibition aufgehoben wird. Die Hämoglobine im Cytosol sorgen in diesem Fall für eine schnelle und effektive Entfernung des Stickstoffmonoxids aus den Mitochondrien (Borisjuk et al. 2008). Eine weitere Folge von Hypoxie ist eine Überreduzierung des Chinonpools durch die von NO verursachte Inhibition der Cytochrom-c-Oxidase (Rhoads et al., 2006). Die zweite terminale Oxidase (Alternative Oxidase, AOX) stellt trotz Unempfindlichkeit gegenüber NO ihre

Aktivität bei Hypoxie ebenfalls ein (Szal et al., 2003), da sie nur eine sehr geringe Affinität für Sauerstoff besitzt (Igamberdiev et al. 2005). Da die AOX in diesem Fall auch ihrer Rolle als Radikalfänger nicht mehr nachkommen kann, werden bei hypoxischen Bedingungen vermehrt reaktive Sauerstoffspezies (ROS) gebildet (Rhoads et al., 2006). Diese äußerst reaktiven sauerstoffhaltigen Moleküle werden an den Komplexen I und III der mitochondrialen Elektronentransportkette gebildet und sind ein Nebenprodukt der aeroben Atmung. Sie entstehen durch eine unvollständige Reduzierung von atmosphärischem Sauerstoff. Es gibt vier Arten von zellulären ROS: Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$), das Superoxidradikal (O_2^-), Wasserstoffsuperoxid (H_2O_2) und das Hydroxylradikal (HO^\bullet). Alle ROS sind extrem reaktiv, besonders der Singulett-Sauerstoff und das Hydroxylradikal (Cruz de Carvalho, 2008). Sie können daher schwerwiegende oxidative Schäden an mitochondrialen Lipiden, Proteinen und DNA hervorrufen (Rhoads et al., 2006). Bei normaler Zellfunktion verhindern entgiftende Enzyme wie die AOX, die Superoxiddismutase und die Ascorbatperoxidase eine Akkumulation von ROS in den Mitochondrien. Somit bleibt die Produktion von mitochondrialen ROS während des Tag/Nacht-Zyklus relativ konstant (Foyer und Noctor, 2003). Daher ist die pflanzliche Zelle möglicherweise in der Lage, Veränderungen der ROS-Konzentration aufgrund von durch biotischen oder abiotischen Stress ausgelösten mitochondrialen Dysfunktionen mittels lokaler Erkennungsmechanismen zu registrieren (Rhoads et al., 2006). Mitochondriale reaktive Sauerstoffspezies haben somit eine Funktion als wichtige Signalmoleküle (Laloi et al., 2004), die eine Veränderung der nuklearen Genexpression, möglicherweise auch als Antwort auf hypoxischen Stress, hervorrufen können.

1.3 Kommunikation zwischen Nukleus und Organellen

1.3.1 Lokalisation von mitochondrialen und plastidären Genen

Mitochondrien und Plastiden sind semiautonome Organellen, deren eigene genetische Information für ihre Biogenese und Funktionsausübung nicht ausreicht. So enthält beispielsweise das Chondriom von *Arabidopsis thaliana* nur für 33 mitochondriale Proteine, drei rRNAs und zwanzig tRNAs kodierende Gene (Unseld et al. 1997; Duchêne und Maréchal-Drouard, 2001). Das pflanzliche mitochondriale Proteom setzt sich dagegen aus ungefähr tausend Proteinen zusammen. Der Großteil dieser Proteine und tRNAs ist im

nukleären Genom kodiert und wird aus dem Cytosol in die Mitochondrien importiert (Braun und Schmitz, 1999; Haucke und Schatz, 1997). Ähnliches gilt für Chloroplasten, von deren circa 3500 bis 4000 Polypeptiden nur ungefähr 200 im Plastom kodiert sind (Soll und Schleiff, 2004). Voraussetzung für eine funktionelle Zusammenarbeit von Nukleus und Mitochondrien bzw. Plastiden ist daher eine koordinierte Interaktion dieser drei Organellen. Die Kommunikation zwischen Nukleus und Organellen kann dabei auf zwei verschiedene Arten ablaufen:

Der anterograde Mechanismus koordiniert die nukleäre sowie die mitochondriale und plastidäre Genexpression in Antwort auf bestimmte Umweltreize oder endogene Signale über einen Satz von Transkriptionsfaktoren oder Koaktivatoren. Auf diese Weise wird das Programm der Genaktivierung so verändert, dass Mitochondrien und Plastiden die zur Anpassung nötigen Proteine synthetisieren oder importieren können (Leister, 2004; Ryan und Hoogenraad, 2007).

Im zweiten Mechanismus reagiert die Zelle auf Veränderungen im funktionellen Status der Mitochondrien und Plastiden. Dieser Prozess wird „Retrograde Regulierung“ genannt. Bei Plastiden wird er durch Veränderungen des Redoxstatus, durch die Synthese von Tetrapyrrol und einen defekten Proteinimport ausgelöst (Inaba, 2010). Bei Mitochondrien ist der Verlust des mitochondrialen elektrochemischen Potentials oder die Ansammlung ungefalteter Proteine die Ursache für diesen Vorgang, der auch als mitochondriale Stressantwort bezeichnet wird (Ryan und Hoogenraad, 2007).

1.3.2 Anterograde Regulierung

Die meisten Genexpression, Wachstum und Entwicklung betreffenden Vorgänge innerhalb der Mitochondrien und Plastiden werden vom Nukleus gesteuert. Dabei gibt es verschiedene Stufen der anterograden Kontrolle organellären Verhaltens. So kann zum Beispiel eine Anpassung auf Transkriptionsebene der nukleär kodierten mitochondrialen und plastidären Proteine erfolgen. Mit diesem Mechanismus lässt sich die Menge an Proteinen in den Organellen kontrollieren (Kleffmann et al., 2004). Eine weitere Regelung findet über den posttranslationalen Import der Proteine in die Mitochondrien und Plastiden statt. Der Import der mit einer spezifischen Signalsequenz versehenen Vorläuferproteine aus dem Cytosol wird dabei durch einen beide Hüllmembranen umspannenden Proteinkomplex ermöglicht. Dieser setzt sich bei Plastiden aus dem Translokton der äußeren Hülle (TOC) und dem Translokton

der inneren Hülle (TIC) zusammen (Soll und Schleiff, 2004). In Mitochondrien übernehmen die Proteinkomplexe der Translokase der äußeren Membran (TOM) und der Translokase der inneren Membran (TIM) diese Funktion (Neupert und Herrmann, 2007; Stengel et al., 2010). Diese Proteine bestehen aus jeweils mehreren Untereinheiten mit unterschiedlichen Funktionen wie der Erkennung der Signalsequenz, Bindung und Entfaltung der Vorläuferproteine, Bildung der Membranpore sowie Regulierung der Durchlässigkeit des Importkanals. Aufgabe des in der äußeren Membran lokalisierten Proteins ist die Erkennung der Signalsequenz und der Import der Vorläuferproteine in den Intermembranraum. Dieser Vorgang ist bei Plastiden GTP- und bei Mitochondrien ATP-abhängig (Soll und Schleiff, 2004; Neupert und Herrmann, 2007). In der inneren Hüllmembran des jeweiligen Organells lokalisierte Proteine müssen in diese eingebracht werden oder die Membran bei einer Lokalisation in der mitochondrialen Matrix bzw. im plastidären Stroma überwinden. Die Translokation dieser Peptide wird dabei von TIC bzw. TIM übernommen und bezieht die dazu notwendige Energie aus dem Membranpotential sowie der Hydrolyse von ATP (Soll und Schleiff, 2004; Neupert und Herrmann, 2007). Chaperone und Hilfsfaktoren bewahren die Vorläuferproteine während des gesamten Importvorgangs vor Degradierung und sorgen am Zielort für deren korrekte Faltung und Anordnung in ihre native dreidimensionale Struktur (Soll und Schleiff, 2004; Neupert und Herrmann, 2007). Die Proteine des TIC/TOC- und des TIM/TOM-Komplexes existieren in verschiedenen Isoformen mit unterschiedlicher Substratspezifität, welche die Ansammlung von gewebespezifischen mitochondrialen und plastidären Proteomen erlaubt (Lister et al., 2004; Soll und Schleiff, 2004). Bei *Arabidopsis thaliana* hat eine Dysfunktion der Mitochondrien nachweislich Einfluss auf die Transkriptionsrate der kernkodierte Bestandteile des Proteinimportmechanismus (Lister, 2004). Bei oxidativem Stress sowie anderen Umweltreizen, die wichtige mitochondriale Funktionen inhibieren, findet ein modifizierter Import statt. Dieser beeinflusst das Vorkommen und die Häufigkeit der mitochondrial lokalisierten Proteine (Taylor et al., 2003a). Die Regulierung des Proteinimports in Chloroplasten ist möglicherweise vom Redoxstatus dieser Organellen abhängig (Küchler et al., 2002). Ein weiterer anterograder Mechanismus ist die Kontrolle der organellären Genexpression, die zum Teil von nukleär kodierten Faktoren vermittelt wird (Leon et al., 1998; Choquet und Wollman, 2002). So sind in mono- und eudikotyledonen Pflanzen sowie in verschiedenen Pilzen wie zum Beispiel *Saccharomyces cerevisiae* und *Neurospora crassa* die Gene von organellären RNA-Polymerasen im Genom des Nukleus enthalten (Hedtke et al., 2007; Yin et al., 2010). *Arabidopsis thaliana* verfügt über drei solcher Gene. Deren Produkte werden entweder in die

Mitochondrien (AtRPOT;1), in die Plastiden (AtRPOT;3) oder in beide Organellen (AtRPOT;2) importiert (Gagliardi und Binder, 2007). Obwohl auf diese Weise Regulierungen auf der Transkriptebene stattfinden, geschieht die Kontrolle der organellären Genexpression hauptsächlich posttranskriptionell (Leon et al. 1998; Rochaix, 2001). Zu den daran beteiligten Mechanismen gehört das *cis*- und *trans*-Spleißen von Intronen der Gruppe II. Diese kommen sowohl in bakteriellen als auch in plastidären und mitochondrialen Genomen vor und kodieren für reverse Transkriptasen, welche für die Mobilität der Introne entscheidend sind. Darüber hinaus funktionieren die Transkriptasen als Maturasen, die das Spleißen der RNA durch die Faltung des Introns in die katalytisch aktive Struktur unterstützen (Mohr und Lambowitz, 2003). Während bakterielle ribozyme Introne der Gruppe II ihre eigene spezifische RNA-Maturase kodieren, konnte in den mitochondrialen und plastidären Genomen von Blütenpflanzen nur jeweils ein offener Leserahmen für ein solches Gen gefunden werden, dem darüber hinaus ein identifizierbares Initiationskodon fehlt (Gagliardi und Binder, 2007; Bonen, 2008). Dagegen wurden im nukleären Genom von *Arabidopsis thaliana* und *Oryza sativa* vier Homologe identifiziert (Mohr und Lambowitz, 2003), von denen drei eine mitochondriale Importsequenz aufweisen. Die vierte Maturase ist dual lokalisiert und wird je nach Startkodon entweder in die Mitochondrien oder die Chloroplasten importiert (Keren et al., 2009). Eine der vier Maturasen ist darüber hinaus wichtig für das korrekte Spleißen des *nad4*-Transkripts (Nakagawa und Sakurai, 2006). Ähnliches gilt für die plastidären Introne der Gruppe II, von denen die meisten ihre Maturasefunktion ebenfalls verloren haben und daher für ein korrektes Spleißen die Interaktion mit nukleär kodierten Proteinen benötigen (Gagliardi und Binder, 2007; Yukari und Barkan, 2006; de Longevialle et al., 2010). Des Weiteren kommt es bei plastidär und mitochondrial kodierten Genen zu einer Edierung der naszenten RNA-Transkripte. Diese Form der posttranskriptionellen Modifizierung beinhaltet die Insertion, Deletion und Substitution von Nukleotiden. In Landpflanzen wird bei Substitutionen die Nukleobase Cytosin durch Uracil ersetzt, wobei auch ein seltenerer Austausch von Uracil gegen Cytosin vorkommen kann (Bruhs und Kempken, 2011; Bolle et al., 2007; Jobson und Qiu, 2008). An diesem Vorgang sind ebenfalls nukleär kodierte Faktoren beteiligt (Takenaka und Brennicke, 2008). Im nukleären Genom kodierte Proteine sind weiterhin an der Translation der organellär kodierten Proteine und deren Autoregulierung beteiligt (Leister, 2005). So sind bei höheren Pflanzen alle Translationsfaktoren wie zum Beispiel der Elongationsfaktor Tu sowie sämtliche Aminoacyl-tRNA-Synthetasen nukleär kodiert. Bei *Arabidopsis thaliana* sind Letztere zudem entweder in den Mitochondrien und in den Plastiden oder in den Mitochondrien und im Cytoplasma

lokalisiert (Gagliardi und Binder, 2007). Posttranslationale Prozesse wie die Anordnung der Multiproteinkomplexe der Thylakoidmembran oder der inneren Hüllmembran der Mitochondrien benötigen genauso wie die Regulierung der Entwicklung und Teilung von Mitochondrien und Plastiden ebenfalls nukleär kodierte Hilfsfaktoren (Leister, 2005; Osteryoung und Nunnari, 2003).

1.3.3 Retrograde Regulierung

Abiotische und biotische Stressformen sowie Mutationen können die Funktion von Mitochondrien und Plastiden beeinflussen. Diese sind nicht zur direkten Kontrolle ihrer eigenen genetischen Systeme in der Lage, da die meisten ihrer Proteine nukleär kodiert sind. Aus diesem Grund müssen diese Organellen Veränderungen der nukleären Genexpression veranlassen können. Dieser Vorgang wird als retrograde Regulierung bezeichnet (Rhoads und Subbaiah, 2007). Dabei handelt es sich weniger um einen einfachen Ein/Aus-Mechanismus, sondern vielmehr um eine ständige Reaktion auf die sich ändernden metabolischen Bedürfnisse der Zelle. Bei Chloroplasten wurden bereits potentielle retrograde Signalwege für die Reaktion auf die Photomorphogenese, die veränderte Funktion während der Biogenese und den Redoxzustand identifiziert (Rhoads und Subbaiah, 2007; Inaba, 2010). Neben Redoxsignalen sind daran möglicherweise Tetrapyrrole beteiligt. Bei diesen Porphyrinverbindungen handelt es sich um Zwischen- und Endprodukte der Häm-, Chlorophyll- und Phytochromobilinsynthese, die in den Plastiden synthetisiert werden (Surpin et al., 2002). Veränderungen des Photosyntheseapparates während der plastidären Entwicklung und als Reaktion auf Umweltreize hätten somit Auswirkungen auf die Häufigkeit von Tetrapyrrolen. Das retrograde Signal der Plastiden würde demnach auf einer veränderten Porphyrinkonzentration beruhen, wie sie in geschädigten oder unfertigen Chloroplasten vorkommt (Rodermeil, 2001). Als möglicher Rezeptor für Tetrapyrrolverbindungen wird dabei die ChlH-Untereinheit der in der plastidären Hüllmembran lokalisierten Magnesiumchelatase diskutiert. Diese ist entweder am Transport der Tetrapyrrole durch die Hüllmembran oder direkt an der Signaltransduktion vom Plastiden zum Nukleus beteiligt (Surpin et al., 2002). Eine Dysfunktion der Mitochondrien und die daraus resultierende retrograde Regulierung ist bei Menschen und Tieren ein wichtiger Faktor bei vielen Krankheiten. Zu diesen gehören Alzheimer, Parkinson, Huntington, bipolare Störungen, Schizophrenie, Typ II Diabetes und Krebs (Rhoads und Subbaiah, 2007). Bei

Pflanzen führt eine durch Mutationen ausgelöste mitochondriale Dysfunktion oft zu männlicher Sterilität, zu einem embryoethalen Phänotyp oder zu chlorotischen Pflanzen, welche nicht bis zur Reife überleben (Newton et al., 2004). Darüber hinaus können Störungen der mitochondrialen Funktion durch biotischen und abiotischen Stress verursacht werden (Rhoads und Subbaiah, 2007). Diese Stressformen haben einen erhöhten Wert an zellulären ROS zur Folge, welche Veränderungen der nukleären Genexpression und somit eine Stressantwort auslösen können. Die Art der Stressantwort hängt dabei von der Menge an ROS ab. Bei geringen Konzentrationen an ROS kommt es zur Synthese von zur Verteidigung nötigen Proteinen und Metaboliten oder zur Anpassung der Pflanze an die veränderten Umweltbedingungen. Bei hohen Konzentrationen wird dagegen der programmierte Zelltod ausgelöst (Vranová et al., 2002). Der mitochondriale Beitrag zur zellulären ROS-Konzentration ist bislang unbekannt. Mitochondriale Dysfunktion bei Pflanzen kann sowohl durch ROS ausgelöst werden als auch zu ihrer Produktion führen (Rhoads et al., 2006). So hat oxidativer Stress eine Inhibierung der mitochondrialen Elektronentransportkette und des Enzyms Aconitase zur Folge (Sweetlove et al., 2002; Taylor et al., 2003a). Eine Hemmung des Cytochrom-c-Wegs führt zu einem Anstieg der mitochondrialen ROS-Konzentration. Auf diese Weise werden mitochondriale retrograde Signale ausgelöst, welche die Expression von nukleär kodierten Proteinen wie zum Beispiel der AOX veranlassen können (Rhoads und Subbaiah, 2007). Eine darauffolgende verstärkte Synthese der Alternativen Oxidase führt zu einer Verminderung der Konzentration an mitochondrialen ROS (Rhoads und Subbaiah, 2007), einer Aufrechterhaltung der Respirationsrate (Vanlerberghe et al., 2002) und somit zu einer Anpassung der Zelle an die veränderten Umweltbedingungen. Über die weiteren Bestandteile des mitochondrialen retrograden Signalwegs bei Pflanzen ist wenig bekannt. Vermutlich agieren mit ROS reagierende Verbindungen wie Lipidperoxide formende Lipide oder entgiftende Systeme wie der Glutathion-Ascorbat-Zyklus als primäre oder sekundäre Signale (Rhoads und Subbaiah, 2007). Weiterhin sind mit hoher Wahrscheinlichkeit Ca^{2+} -Ionen an diesen Signalweg beteiligt (Rhoads und Subbaiah, 2007). Kalzium ist ein allgegenwärtiger sekundärer Botenstoff in eukaryotischen Signaltransduktionskaskaden, welcher im Gegensatz zu den meisten anderen Ionen nicht frei in der Zelle diffundiert. Pflanzen besitzen daher mehrere Kalziumspeicher, zu denen der Apoplast, die Vakuole, die Kernhülle, das endoplasmatische Retikulum, die Chloroplasten sowie die Mitochondrien gehören. Daher kann jeder Stimulus durch Beeinflussung unterschiedlich lokalisierter Ca^{2+} -Kanäle, H/Ca^{2+} -Antiportern sowie Ca^{2+} - und H -ATPasen eine charakteristische Ca^{2+} -Welle auslösen (Cheng et al., 2002). So ist seit einiger Zeit bekannt, dass Sauerstoffmangel einen

sofortigen reversiblen Anstieg des Gehalts an Ca^{2+} -Ionen im Cytosol auslöst (Subbaiah et al., 1998). Diese Änderungen treten vor allem in Gegenwart der Mitochondrien auf und können durch Blockierung der mitochondrialen Ca^{2+} -Kanäle vermieden werden (Subbaiah et al., 1994). Auch Kälte, oxidativer und osmotischer Stress führen zu einem Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration (Rhoads und Subbaiah, 2007). Dies weist auf eine wichtige Funktion von Ca^{2+} -Ionen in der pflanzlichen Reaktion auf Stress hin. Der Strom von Ca^{2+} -Ionen in und aus den Mitochondrien ist somit wahrscheinlich Teil der gesamten Ca^{2+} -Bilanz während der pflanzlichen Stressantwort. Die genaue Übertragung des mitochondrialen Ca^{2+} -Signals zum Nukleus und dortige Beeinflussung der Genexpression ist bislang unklar (Rhoads und Subbaiah, 2007). Durch konventionelle und konfokale mikroskopische Untersuchungen wurde eine Begleitung des durch Anoxie hervorgerufenen Anstiegs der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration von einer erhöhten Ca^{2+} -Konzentration im Nukleus gezeigt (Subbaiah et al., 1998). Da nukleäres Kalzium für die Initiierung der Transkription benötigt wird (Pusl et al., 2002), könnte das Ca^{2+} -Signal selbst bis zum Zellkern vordringen und dort Veränderungen in der Genexpression veranlassen. Möglich wäre auch eine zusätzliche Beteiligung von Proteinkinasen und Ca^{2+} -bindenden Proteinen wie kalziumabhängigen Proteinkinasen (CDPKs), Calmodulinen, calcineurin-B-artigen Proteinen, Transkriptionsfaktoren und regulatorischen Proteinen an der mitochondrialen retrograden Signalkette (Sanders et al., 2002; Tuteja und Mahajan, 2007). Durch Mitogene aktivierte Proteinkinasen können demnach durch mitochondriale Dysfunktion induziert werden (Takahashi et al., 2003). Dafür spricht die Involvierung von zum Teil durch ROS modulierten Proteinkinasen sowie von kalziumabhängigen Proteinkinasen in der pflanzlichen Stressantwort (Pitzschke und Hirt, 2006; Cheng et al., 2002; Romeis et al., 2001). Besonders die letzteren spielen aufgrund der Ausschüttung von Ca^{2+} -Ionen aus den Mitochondrien ins Cytosol bei biotischem und abiotischem Stress möglicherweise eine größere Rolle in der mitochondrialen retrograden Signaltransduktion. Mitglieder der CDPK-Proteinfamilie stellen nur bei Pflanzen und einigen Protozoen vorkommende Serin/Threonin-Proteinkinasen dar. Typisch sind vier unterschiedliche Domänen: Eine variable N-terminale Domäne, eine Domäne mit Proteinkinasefunktion, eine autoinhibitorische als Pseudosubstrat fungierende Domäne und eine calmodulinartige Domäne. *Arabidopsis thaliana* besitzt 34 Mitglieder dieser Proteinfamilie, die sich voneinander durch die Länge und Zusammensetzung ihrer N-terminalen Domäne unterscheiden und je nach Verwandtschaftsgrad in vier Untergruppen eingeteilt werden (Cheng et al., 2002). Die Aktivierung erfolgt durch Bindung von Kalziumionen an die calmodulinartige Domäne.

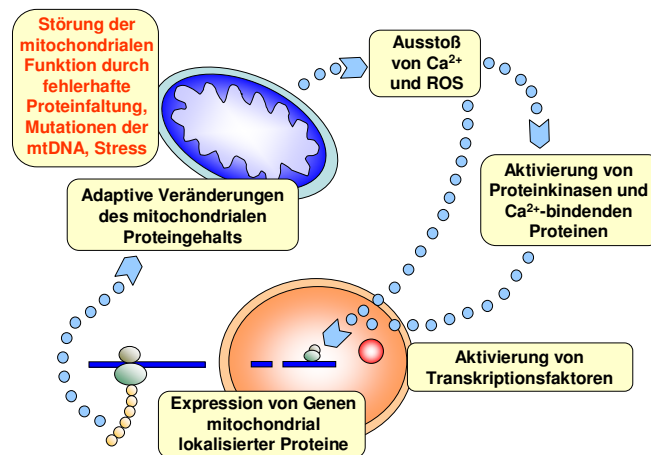


Abbildung 1.4: Mögliches Modell für die mitochondriale retrograde Regulierung.

Biotischer und abiotischer Stress, fehlerhafte Proteinfaltung und Mutationen der mtDNA führen zu einer mitochondrialen Dysfunktion. Es kommt zum Ausstoß von Ca²⁺-Ionen und ROS. Diese verursachen entweder direkt oder über verschiedene Proteinkinasen und Ca²⁺-bindende Proteine die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren im Nukleus. Daraufhin kommt es zur Expression von Genen mitochondrial lokalisierter Proteine. Deren Translationsprodukte werden in die Mitochondrien importiert, so dass eine adaptive Veränderung des mitochondrialen Proteingehalts zustande kommt (verändert nach Ryan und Hoogenraad, 2007).

Spezifische an der mitochondrialen retrograden Regulierung beteiligte Transkriptionsfaktoren wurden bisher bei *Arabidopsis thaliana* und *Saccharomyces cerevisiae* identifiziert (Giraud et al., 2009; Liu und Butow, 1999). Bei den Transkriptionsfaktoren RTG1, RTG2 und RTG3 aus *S. cerevisiae* handelt es sich um Helix-Loop-Helix/Leucin-Zipper-Proteine. Sie initiieren die Transkription von vier für Enzyme des Trikarbonsäurezyklus kodierenden Genen durch Bindung an die DNA als heterodimerer Komplex (Liu und Butow, 1999). Der bei *Arabidopsis thaliana* identifizierte Transkriptionsfaktor ABI4 gehört zu den Mitgliedern der AP2/ERF-Familie (Bossi et al., 2009; Licausi et al., 2010). Er reguliert die mitochondriale retrograde Expression des für die Isoform 1a der Alternativen Oxidase kodierenden Gens (Giraud et al., 2009). Weitere mögliche Kandidaten für den mitochondrialen retrograden Signalweg wären aufgrund ihrer Beteiligung an biotischen und abiotischen Stressantworten eventuell Leucin-Zipper-Proteine wie bZIP sowie Mitglieder der Zinkfinger-Proteinfamilien WRKY und Dof (Chen et al., 2002). Ein Modell für die pflanzliche mitochondriale retrograde Regulierung müsste daher sowohl reaktive Sauerstoffspezies, einen Ca²⁺-Efflux, diverse Proteinkinasen und Ca²⁺-bindende Proteine sowie obengenannte Transkriptionsfaktoren miteinbeziehen (siehe Abbildung 1.4). Eine genaue Charakterisierung der letzten drei Komponenten wurde bisher nicht durchgeführt (Rhoads und Subbaiah, 2007).

1.4 Problemstellung

Hypoxie kommt bei fast allen Pflanzen während ihres Wachstum und ihrer Entwicklung vor. Eine Unterversorgung mit Sauerstoff verändert die Genexpression, den Energieverbrauch und den zellulären Metabolismus des Organismus. Dies betrifft nicht nur Wild-, sondern auch zahlreiche Kulturpflanzen. Selbst ein kurzer oder nur in einigen Bestandteilen der Pflanze auftretender Sauerstoffmangel führt zur Beschädigung von Pflanzen wie Reis oder Tomaten. Grund dafür ist möglicherweise die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies und der daraus resultierende Schaden an zellulären und organellären Membranen (Jackson, 2008). Daher haben Pflanzen im Lauf der Evolution Systeme zur Wahrnehmung von Sauerstoffmangel als auch darauf ansprechende Signalwege entwickelt, um sich an die veränderten Umweltbedingungen anpassen zu können (Rhoads und Subbaiah, 2007). Obwohl es Modelle für die Sauerstoffwahrnehmung bei Pflanzen gibt, die den Mitochondrien, Stickstoffmonoxid, Ca^{2+} -Ionen und mitochondrialen reaktiven Sauerstoffspezies eine Schlüsselrolle in diesem Prozess zukommen lassen (Borisjuk et al., 2008; Rhoads und Subbaiah, 2007), wurde der eigentliche Sauerstoffsensor bei Pflanzen bisher nicht identifiziert. Über die Weiterleitung des Hypoxiesignals an den Nukleus ist ebenfalls wenig bekannt. Mit hoher Wahrscheinlichkeit sind mitochondriale ROS und Ca^{2+} -Ionen daran beteiligt (Rhoads, 2006; Subbaiah et al., 1994; Subbaiah et al., 1998). Diskutiert wird weiterhin eine Beteiligung von kalziumbindenden Proteinen sowie von verschiedenen, an biotischen und abiotischen Stressantworten beteiligten Transkriptionsfaktoren (Sanders et al., 2002, Tuteja und Mahajan, 2007; Chen et al., 2002).

Über die genaue Anzahl hypoxiebeeinflusster mitochondrialer Proteine und ihre Regulierung durch retrograde Signaltransduktion ist nur wenig bekannt. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit die Auswirkung von Hypoxie auf das Transkriptom und mitochondriale Proteom von *Arabidopsis thaliana* untersucht werden. Zu diesem Zweck sollten mittels bioinformatischer Methoden, quantitativer Real Time PCR und GFP-Fusionskonstrukten mögliche hypoxiebeeinflusste nukleär kodierte mitochondrial lokalisierte Proteine identifiziert werden. Basierend auf diesen Ergebnissen sollten im Rahmen dieser Arbeit Reportergenkonstrukte zur Untersuchung der gewebe- und entwicklungsspezifischen Beeinflussung durch Hypoxie erstellt werden. Aufgrund des Einflusses von posttranskriptionellen Modifikationen auf Häufigkeit und Funktion von Proteinen sind zusätzliche Untersuchungen auf Proteomebene sinnvoll. Während bei Reiskeimlingen bereits mögliche Veränderungen der Zusammensetzung des mitochondrialen Proteoms unter Anoxie untersucht wurden

(Millar et al., 2004), fehlen bisher derartige Analysen für dikotyle Pflanzen. In dieser Arbeit sollte aus diesem Grund die Auswirkung von Hypoxie auf das mitochondriale Proteom von *Arabidopsis thaliana* untersucht werden. Eine Auftrennung der isolierten Proteine nach Ladung und Größe mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese, gefolgt von einer massenspektrometrischen Analyse sollte hierbei die Bestimmung von bisher unbekannten hypoxiebeeinflussten mitochondrialen Proteinen ermöglichen.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung von möglichen Komponenten des mitochondrialen retrograden Signaltransduktionswegs. Für diese Rolle in Frage kamen dabei im Cytosol oder in der Plasmamembran lokalisierte kalziumabhängige Proteinkinasen (CDPKs). Mittels bioinformatischen Methoden und quantitativer Real Time PCR sollten entsprechende Gene identifiziert und bezüglich der Expression von nukleär kodierten Genen mitochondrial lokalisierter Proteine charakterisiert werden.

Für erste Hinweise auf metabolische Funktionen sollten T-DNA-Insertionsmutanten von nukleär kodierten hypoxiebeeinflussten Genen mitochondrialer Proteine sowie von CDPKs auf die Ausbildung möglicher phänotypischer Merkmale bei Hypoxie und Normoxie untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Organismen

Bakterien:

Escherichia coli (K12) XL1-Blue

- recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac [F'*proAB lac^qZΔM15, Tn10* (*Tet^r*)]^c (Bullock et al., 1987); Stratagene (La Jolla, USA)

Agrobacterium tumefaciens [C58C1][pMP90]

- T-DNA⁺, vir⁺ der Nopaline-Gruppe, rif^r, enthält Helfer-Plasmid pMP90, gent^r (Koncz und Schell, 1986)

Pflanzen:

Arabidopsis thaliana

- Linie Columbia 0, (Lehle Seeds, Texas, USA)
- SALK_049834; T-DNA-Insertionsmutante für At1g52560 (Salk Institute, La Jolla, USA)
- SALK_067374; T-DNA-Insertionsmutante für At1g68130 (Salk Institute, La Jolla, USA)
- SALK_066538; T-DNA-Insertionsmutante für At1g76650 (Salk Institute, La Jolla, USA)
- SALK_054248; T-DNA-Insertionsmutante für At2g05080 (Salk Institute, La Jolla, USA)
- SALK_084897; T-DNA-Insertionsmutante für At3g22370 (Salk Institute, La Jolla, USA)
- SALK_118536; T-DNA-Insertionsmutante für At5g51440 (Salk Institute, La Jolla, USA)
- SALK_079017; T-DNA-Insertionsmutante für At3g08590 (Nottingham Arabidopsis Stock Centre, Nottingham, UK)
- SAIL_210_D11; T-DNA-Insertionsmutante für At4g27585 (Nottingham Arabidopsis Stock Centre, Nottingham, UK)
- SALK_007958; T-DNA-Insertionsmutante für At4g04740 (Salk Institute, La Jolla, USA)
- SALK_136629; T-DNA-Insertionsmutante für At4g04710 (Salk Institute, La Jolla, USA)
- DR5:GUS (Ulmasov et al., 1997)

Arabidopsis thaliana-Zellkultur

- Linie MM1 (Menges und Murray, 2002)

Brassica oleracea var. *botrytis*

- aus örtlichen Supermärkten

2.1.2 Oligonukleotide

Die zur Amplifizierung von DNA in der Polymerasekettenreaktion (PCR), von Transkripten in der reversen Transkription und der quantitativen Real Time PCR als auch für die Sequenzierung verwendeten Oligonukleotide (siehe Tabelle 2.1) wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) synthetisiert. Die unterstrichenen Bereiche kennzeichnen Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen.

Tabelle 2.1: Liste sämtlicher in dieser Arbeit verwendeten DNA-Oligonukleotide

Name	Sequenz (5' - 3')	Spezifität
FK258	CAACAGACAATCGGCTGCT	<i>nptII</i> , fwd
FK259	CGGCGATACCGTAAAGCAC	<i>nptII</i> , rev
FK357	GATTAATTGATTGGATACCCG AGAAC	<i>A. thaliana coxII</i> 629-Intron- flankierend, fwd
FK492	ATGGCTGAGGCTGATGATATTC	Actin 2, fwd
FK493	GCACAGTGTGAGACACACC	Actin 2, rev
FK587	GTAATCCAATTCGGCTAAGCGGC	<i>nptIII</i> , fwd
FK588	CCGTCGATACTATGTTATACGCC	<i>nptIII</i> , rev
FK638	GCGCTTTATGGCATTTCCTACTATA	<i>A. thaliana coxII</i> 629-Intron- flankierend, rev
AB1088	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG	T-DNA <i>Left Border</i> -Sequenz, für PCR-Amplifikation der flankierenden Sequenzen

Name	Sequenz (5' - 3')	Spezifität
CW1111	GTATGATCGCGAGAGTGAGACA	<i>A. thaliana</i> At2g05080, fwd; für quant. Real Time PCR
CW1112	AGTGCAGCAGAGAGTGTTTTCC	<i>A. thaliana</i> At2g05080, rev; für quant. Real Time PCR
CW1113	ATGGCATCTGCTCTCGCTCTTA	<i>A. thaliana</i> At4g25200, fwd; für quant. Real Time PCR
CW1114	TGTTGAAGAGGCGCGAGGAAAC	<i>A. thaliana</i> At4g25200, rev; für quant. Real Time PCR
CW1115	CATGGACCAGGTAAGCGAAATC	<i>A. thaliana</i> At5g51440, fwd; für quant. Real Time PCR
CW1116	CTTAGATGCAACGCGTCGTCTT	<i>A. thaliana</i> At5g51440, rev; für quant. Real Time PCR
CW1119	CTCTTTGTCGCTGTCTCTGTTG	<i>A. thaliana</i> At3g26520, fwd; für quant. Real Time PCR
CW1120	ACGGAGGAGAGTGATGTTACCA	<i>A. thaliana</i> At3g26520, rev; für quant. Real Time PCR
CW1121	CAGGCGTTCTGGTAAGGAGATT	<i>A. thaliana</i> At5g60390, fwd; für quant. Real Time PCR
CW1122	CTCATGTCCCTAACAGCGAAAC	<i>A. thaliana</i> At5g60390, rev; für quant. Real Time PCR
CW1123	AATTCTCCGGTCTGCGTATGAG	<i>A. thaliana</i> At1g42970, fwd; für quant. Real Time PCR
CW1124	TTCGCCACTGTCTCTCCTCTAA	<i>A. thaliana</i> At1g42970, rev; für quant. Real Time PCR
CW1134	TATGGACTAGAGCTCCGACGATT	<i>A. thaliana</i> At3g22370, fwd; für quant. Real Time PCR
CW1135	GGTGGATTTCGTTCTCTGTTTTTC	<i>A. thaliana</i> At3g22370, rev; für quant. Real Time PCR
CW1160	GCGAGCTTAATTAA-CAACCACAA TGATTCCCTGTAGTCCTC	<i>A. thaliana</i> At2g05080-Promotor, fwd; mit <i>PacI</i> -Schnittstelle

Name	Sequenz (5' - 3')	Spezifität
CW1161	CTCGAC <u>GGCGCGCC</u> -TGGTTA GCAATGCATAAAGTAATTCT	<i>A. thaliana</i> At2g05080-Promotor, rev; mit <i>AscI</i> -Schnittstelle
CW1164	GCCGTTAATTAA- GCTTGCTCAACGCTTCGGAGT	<i>A. thaliana</i> At4g25200-Promotor, fwd; mit <i>PacI</i> -Schnittstelle
CW1165	CTAT <u>GGCGCGCC</u> - TGTAAGAGAAACAGGAAGCTTTG	<i>A. thaliana</i> At4g25200-Promotor, rev; mit <i>AscI</i> -Schnittstelle
CW1166	GCGCGCTTAATTAA- CCACTAAAGAAGCAACGCAATCCC	<i>A. thaliana</i> At5g51440-Promotor, fwd; mit <i>PacI</i> -Schnittstelle
CW1167	CTCTGCG <u>GGCGCGCC</u> -TTTTGGAA AGAGAAGAAGCTTAGAAT	<i>A. thaliana</i> At5g51440-Promotor, rev; mit <i>AscI</i> -Schnittstelle
CW1168	ATATTAG <u>GGCGCGCC</u> - <u>CCTAGG</u> - CCATGGTCACCCTCCGCCGCCTC	Amplifizierung <i>gusA</i> - Gen aus pNW492, fwd; mit <i>AscI</i> - und <i>BlnI</i> -Schnittstelle
CW1194	AGTGCCAGGATCC- CATTGTTTGCCTCCCTGCTGCGGTTT	Amplifizierung <i>gusA</i> - Gen aus pNW492, rev; mit <i>BamHI</i> - Schnittstelle
CW1213	CGGAACAACAACCATCCACTTT	<i>A. thaliana</i> At1g68130, fwd; für quant. Real Time PCR
CW1214	AGGCTGGTCTCATCAGCACAAT	<i>A. thaliana</i> At1g68130, rev; für quant. Real Time PCR
CW1232	GCCTTTTTCTTGCAAACCTCACA	<i>A. thaliana</i> At1g52560, fwd; für quant. Real Time PCR
CW1233	TTCTCAAAGCCAGACGAGCTAGA	<i>A. thaliana</i> At1g52560, rev; für quant. Real Time PCR
CW1234	AGCCGTAGCTGCTGTTAGATTG	<i>A. thaliana</i> At1g76650, fwd; für quant. Real Time PCR
CW1235	CCTTGAGCTCCATCTTCTTCTCTT	<i>A. thaliana</i> At1g76650, rev; für quant. Real Time PCR
CW1249	TAGGTCCTTTACGTCCTGTAG	<i>gusA</i> , fwd
FK1256	CCCTGCTGCGGTTTTTCACC	<i>gusA</i> , rev

Name	Sequenz (5' - 3')	Spezifität
CW1264	GCCCCAAATCGAT- AGCCGATCTTG	<i>A. thaliana</i> At1g76650-Promotor, fwd; mit <i>Cla</i> I-Schnittstelle
CW1265	GAGAAATAGGGGCGCGCC- CTTTTCTG	<i>A. thaliana</i> At1g76650-Promotor, rev; mit <i>Asc</i> I-Schnittstelle
CW1290	CGCCGGGTAAATTA- TTGTGACGGCTTGTTTATGG	<i>A. thaliana</i> At1g52560-Promotor, fwd; mit <i>Pac</i> I-Schnittstelle
CW1291	CGCTTACTGGCGCGCC- GGTTGGTTTCTAAGAGGTGTTAG	<i>A. thaliana</i> At1g52560-Promotor, rev; mit <i>Asc</i> I-Schnittstelle
CW1317	GCGGCAGTTAATTA- GAGTCGTCGCTATGGAGCCAAG	<i>A. thaliana</i> At3g26520-Promotor, fwd; mit <i>Pac</i> I-Schnittstelle
CW1318	GCCTGTCTGGCGCGCC- TCGGAAAAAGTGAAATCTCAAATC	<i>A. thaliana</i> At3g26520 Promotor, rev; mit <i>Asc</i> I-Schnittstelle
CW1319	GCGGCAGTTAATTA- GGTTCCTATAGGCTACGCGTAA	<i>A. thaliana</i> At1g68130-Promotor, fwd; mit <i>Pac</i> I-Schnittstelle
CW1320	CATGGCCAGGCGCGCC- AGAGAGAGAAACAAAGGGCTTTG	<i>A. thaliana</i> At1g68130-Promotor, rev; mit <i>Asc</i> I-Schnittstelle
CW1411	GAAGCGTCTGATGTGGATGGTAA	<i>A. thaliana</i> At4g04740, fwd; für quant. Real Time PCR
CW1412	TGTGTACGTGCTCATCGTGATG	<i>A. thaliana</i> At4g04740, rev; für quant. Real Time PCR
CW1413	AGGGCTACAAGCAGAGTCAGTGT	<i>A. thaliana</i> At2g35890, fwd; für quant. Real Time PCR
CW1414	CGTAGTCCCAAACGTGCCATGA	<i>A. thaliana</i> At2g35890, rev; für quant. Real Time PCR
CW1415	TGGATGTCGTTTCATCGTGATCT	<i>A. thaliana</i> At4g04710, fwd; für quant. Real Time PCR
CW1416	TAAACAGAACACCCAGAAATCGA	<i>A. thaliana</i> At4g04710, rev; für quant. Real Time PCR
CW1962	TACAAACTCACGGAGGAAACG	SALK_049834; At1g52560; <i>Left Border</i> -flankierende Sequenz

Name	Sequenz (5' - 3')	Spezifität
CW1963	CTTGTTCAACCAGCCGAAGTAG	SALK_049834; At1g52560; <i>Right Border</i> -flankierende Sequenz
CW1964	GATGGGTGTTGATGTTCTTGG	SALK_067374; At1g68130; <i>Left Border</i> -flankierende Sequenz
CW1965	CTGATTCGTCTCACTTGTGGG	SALK_067374; At1g68130; <i>Right Border</i> -flankierende Sequenz
CW1966	AAAGAAGGAATAGCAAATAGA AACAC	SALK_054248; At2g05080; <i>Left Border</i> -flankierende Sequenz
CW1967	TTGATTTTGGATGAGAAAGGG	SALK_054248; At2g05080; <i>Right Border</i> -flankierende Sequenz
CW1968	ATGTTCCAACGACGTTTCTTG	SALK_084897; At3g22370; <i>Left Border</i> -flankierende Sequenz
CW1969	TCGAATCAATGATACCCAATTG	SALK_084897; At3g22370; <i>Right Border</i> -flankierende Sequenz
CW1970	TCGACGATGATGATGTTGAAG	SALK_118536; At5g51440; <i>Left Border</i> -flankierende Sequenz
CW1970	TCGACGATGATGATGTTGAAG	SALK_118536; At5g51440; <i>Left Border</i> -flankierende Sequenz
CW1971	CCTACTCGTAAACCTCCGTCC	SALK_118536; At5g51440; <i>Right Border</i> -flankierende Sequenz
CW1972	TTTCTATGTGTGCCTTGGTTTG	SALK_066538; At1g76650; <i>Left Border</i> -flankierende Sequenz
CW1973	CATCAGCATTGAGATCAAAAGC	SALK_066538; At1g76650; <i>Right Border</i> -flankierende Sequenz
CW1974	AAAGAAGCAAGAAAAACACACC	SALK_136629; At4g04710; <i>Left Border</i> -flankierende Sequenz
CW1975	CGAATAACTCACCACCACCAC	SALK_136629; At4g04710; <i>Right Border</i> -flankierende Sequenz
CW1976	TTTGTGTGTTCTGTTTGCAGG	SALK_007958; At4g04740; <i>Left Border</i> -flankierende Sequenz

Name	Sequenz (5' - 3')	Spezifität
CW1977	CTTTCATTGCGAGAAGGACTG	SALK _007958; At4g04740; <i>Right Border</i> -flankierende Sequenz
JB1989	CGGCCGGTACC-TATCTCAT CGAGCTTGAAAATAATTAATCAC	<i>A. thaliana</i> At5g51440-Präsequenz, fwd; mit <i>KpnI</i> -Schnittstelle
JB1993	GCGCCGGTACC-ACAGTTCTCAGAT AAATACTAAACTCACTGT TAAA	<i>A. thaliana</i> At4g25200-Präsequenz, fwd; mit <i>KpnI</i> -Schnittstelle
JB1995	CGCGCGGTACC-TTTCTCAT TCA CTTTTCATTTCAAAAGTAAAA	<i>A. thaliana</i> At1g76650-Präsequenz, fwd; mit <i>KpnI</i> -Schnittstelle
CW2092	CACTGGGTCGAC- GAACATTCTTCTTTGGCTTCTC	<i>A. thaliana</i> At1g52560-Präsequenz, rev; mit <i>SalI</i> -Schnittstelle
CW2093	GTACCGTCGAC- AGCGCATCATAAGAGCAAAC	<i>A. thaliana</i> At1g76650-Präsequenz, rev; mit <i>SalI</i> -Schnittstelle
CW2095	CAGCATGTCGAC- GTTCTTTTCATCTTCGGGATCAC	<i>A. thaliana</i> At4g25200-Präsequenz, rev; mit <i>SalI</i> -Schnittstelle
CW2096	CAGTTCGTCGAC- TCATTTCCGCCTTAATCTC	<i>A. thaliana</i> At5g51440-Präsequenz, rev; mit <i>SalI</i> -Schnittstelle
CW2106	AGCTAGGTACC- AAACAATGGCTCTAGCTCGTCTG	<i>A. thaliana</i> At1g52560-Präsequenz, fwd; mit <i>KpnI</i> -Schnittstelle
AB2112	GGACATCAATGGTATCGGAC	<i>A. thaliana coxII</i> , fwd; für quant. Real Time PCR
AB2113	GAGTTTTGGCTGGTACAACC	<i>A. thaliana coxII</i> , rev; für quant. Real Time PCR
CW2179	TGGCGGGTACC- ATGATAGACTACGAGAGAAG	<i>A. thaliana</i> At1g68130-Präsequenz, fwd; mit <i>KpnI</i> -Schnittstelle
CW2180	AGCCAGTCGAC- CGGTTTGTGTAGCGTTTGTG	<i>A. thaliana</i> At1g68130-Präsequenz, rev; mit <i>SalI</i> -Schnittstelle
CW2244	TAATGGTGCTAATGCTGAAAAG	Amplifizierung von pOL-GFP + <i>A. thaliana</i> At2g05080-Präsequenz, fwd

Name	Sequenz (5' - 3')	Spezifität
CW2245	CTGAGTGCTTCCGATCTG	Amplifizierung von pOL-GFP + <i>A. thaliana</i> At2g05080-Präsequenz, rev
CW2281	CACTTCTCGACGACTTCGATC	SALK_079017; At3g08590; <i>Left Border</i> -flankierende Sequenz
CW2282	ACAATGGCGTTCGTACTTTTG	SALK_079017; At3g08590; <i>Right Border</i> -flankierende Sequenz
CW2283	AGCTAGAGCACAAGCAACTG	SAIL_210_D11; At4g27585; <i>Left Border</i> -flankierende Sequenz
CW2284	CTTTTCTGCTGGCAAATTCTG	SAIL_210_D11; At4g27585; <i>Right</i> <i>Border</i> -flankierende Sequenz
CW2285	TAGCATCTGAATTTTCATAACCA ATCTCGATACAC	LB3, T-DNA <i>Left Border</i> -Sequenz für SAIL_210_D11; At4g27585
CW2306	GCGAAGACGACATGGGAAAC	<i>A. thaliana</i> At3g08590, fwd; für quant. Real Time PCR
CW2307	GAAGCAAGGGCGAGATCAAC	<i>A. thaliana</i> At3g08590, rev; für quant. Real Time PCR
CW2308	ACCTTCTCTCAACTGGCAAGGA	<i>A. thaliana</i> At1g02930, fwd; für quant. Real Time PCR
CW2309	TGCTCCCAAACAAGCTTTGAA	<i>A. thaliana</i> At1g02930, rev; für quant. Real Time PCR
CW2310	TTCGTCTTCTTCCCTGGAAATC	<i>A. thaliana</i> At1g04820, fwd; für quant. Real Time PCR
CW2311	AGCATTTCCGACCTGGATACC	<i>A. thaliana</i> At1g04820, rev; für quant. Real Time PCR
CW2312	GCACGAGTCCTGAATTTGCTT	<i>A. thaliana</i> At3g16480, fwd; für quant. Real Time PCR
CW2313	GCGCGATCAAGATGTTTCTG	<i>A. thaliana</i> At3g16480, rev; für quant. Real Time PCR
CW2314	AGTAGAGGCGGCGAGTTTGA	<i>A. thaliana</i> At4g27585, fwd; für quant. Real Time PCR

Name	Sequenz (5' - 3')	Spezifität
CW2315	TGAAGCACCACTTGGAAGCA	<i>A. thaliana</i> At4g27585, fwd; für quant. Real Time PCR
CW2329	AGATTCCTTAGGTTTGCTCGC	SAIL_210_D11; At4g27585; <i>Right Border</i> -flankierende Sequenz
CW2330	GGCTCTAATAACCGATCAGGC	SAIL_210_D11; At4g27585; <i>Left Border</i> -flankierende Sequenz
CW2341	CTCCAGGTACC-ATGGGTAATTG CTGCGGAAG	<i>A. thaliana</i> At4g04710-Präsequenz, fwd; mit <i>KpnI</i> -Schnittstelle
CW2342	GCCTCGTCGAC-CATAGCTTCCC TCTAATACTTCAG	<i>A. thaliana</i> At4g04710-Präsequenz, rev; mit <i>SalI</i> -Schnittstelle
CW2415	CTGCTAACCGGATTGCATTG	SALK_049834; At1g52560; <i>Left Border</i> -flankierende Sequenz

2.1.3 Plasmide

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 2.2 aufgeführt. Die entsprechenden Plasmidkarten befinden sich im Anhang.

Tabelle 2.2: Liste sämtlicher in dieser Arbeit verwendeten Plasmide

Name	Charakteristika	Referenz
pBlueskriptII SK+	Klonierungsvektor, <i>dlacZ</i> -Gen zur „Blau-Weiß-Selektion“	Stratagene, La Jolla (USA)
pHS594	T-DNA-Klonierungsvektor	Schmidt, 2007
pMon	Derivat des pBlueskript, T-Klonierungsvektor	Borovkov und Rivkin, 1997
pNW492	<i>gusA</i> -Gen	Weiland, 2005

Name	Charakteristika	Referenz
pOL-GFPS65C	GFP-S65C mit 2 x CaMV35S-Promotor, ohne Präsequenz, zur transienten Transformation	Peeters et al., 2000
pCW647	<i>gusA</i> -Gen mit At2g05080-Promotor, kloniert in pHS594	diese Arbeit
pCW648	<i>gusA</i> -Gen mit At3g22370-Promotor, kloniert in pHS594	diese Arbeit
pCW649	<i>gusA</i> -Gen mit At4g25200-Promotor, kloniert in pHS594	diese Arbeit
pCW650	<i>gusA</i> -Gen mit At5g51440-Promotor, kloniert in pHS594	diese Arbeit
pCW659	<i>gusA</i> -Gen mit At1g52560-Promotor, kloniert in pHS594	diese Arbeit
pCW660	<i>gusA</i> -Gen mit At1g68130-Promotor, kloniert in pHS594	diese Arbeit
pCW661	<i>gusA</i> -Gen mit At1g76650-Promotor, kloniert in pHS594	diese Arbeit
pJB696	At1g52560-Präsequenz, kloniert in pOL-GFPS65C	diese Arbeit
pJB697	At1g76650-Präsequenz, kloniert in pOL-GFPS65C	diese Arbeit
pJB698	At2g05080-Präsequenz, kloniert in pOL-GFPS65C	diese Arbeit

Name	Charakteristika	Referenz
pJB699	At4g25200-Präsequenz, kloniert in pOL-GFPS65C	diese Arbeit
pJB700	At5g51440-Präsequenz, kloniert in pOL-GFPS65C	diese Arbeit
pCW721	At1g68130-Präsequenz, kloniert in pOL-GFPS65C	diese Arbeit
pCW761	At4g04710-Präsequenz, kloniert in pOL-GFPS65C	diese Arbeit

2.1.4 Membranen und Filter

Cellulose-Membran-Filter

Millipore (Schwalbach)

Miracloth

Calbiochem (La Jolla, USA)

2.1.5 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden soweit nicht anders angegeben von den Firmen Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (München), Serva (Heidelberg), Roche (Mannheim), Qiagen (Hilden), BioRad (München), Fluka (München), Merck (Darmstadt), Duchefa (Haarlem, Niederlande), Lehle Seeds (Texas, USA) und GE Healthcare (München) bezogen.

2.1.6 Enzyme

Tabelle 2.3: Liste sämtlicher in dieser Arbeit verwendeten Enzyme

Enzym	Hersteller
Antarctic Phosphatase	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
Cellulase Onozuka R-10	Duchefa (Haarlem, Niederlande)
DNAseI (RNAse frei)	Fermentas (Leon-Rot)
HotStarTaq DNA Polymerase (aus dem QuantiTect™ SYBR® Green RT-PCR Kit)	Qiagen (Hilden)
Macroenzym R-10	Duchefa (Haarlem, Niederlande)
Omniscrit und Sensiscript Reverse Transkriptase (aus dem QuantiTect™ SYBR® Green RT-PCR Kit)	Qiagen (Hilden)
<i>Pwo</i> -DNA-Polymerase	Peqlab (Erlangen)
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
Reverse Transkriptase (aus dem „OneStep“ RT-PCR Kit)	Qiagen (Hilden)
RevertAid™ Premium Reverse Transkriptase (aus dem RevertAid™ Premium First Strand cDNA Synthesis Kit)	Fermentas (Leon-Rot)
RNAse A	Roth (Karlsruhe)
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Molzym (Bremen)
Trypsin	Promega (Mannheim)

2.1.7 Kits

NucleoSpin Plasmid Quick Pure	Macherey & Nagel (Düren)
NucleoSpin Extract II	Macherey & Nagel (Düren)
Nucleobond PC 100	Macherey & Nagel (Düren)

OneStep RT-PCR-Kit	Qiagen (Hilden)
QuantiTect™ SYBR® Green RT-PCR Kit	Qiagen (Hilden)
RevertAid™ Premium First Strand Synthesis Kit	Fermentas (Leon-Rot)

2.1.8 Puffer und Lösungen

Anodenpuffer

20 mM Tris-HCl, 150 mM Glycin, 30% (v/v) Methanol

Bleichlösung

50% (v/v) Natriumhypochlorid, 0,05% (v/v) Tween-20

Coomassie-Färbelösung

45% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure, 45% (v/v) ddH₂O, 0,5% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250 oder G250

DNA-Ladepuffer

40% (w/v) Saccharose, 50 mM EDTA, 0,001% (w/v) Bromphenolblau

DNA-Lysepuffer

10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 2% (w/v) SDS, pH 8,0

Entfärbelösung für Coomassie-gefärbte Polyacrylamidgele

10% (v/v) Essigsäure, 40% (v/v) Ethanol, 50% (v/v) ddH₂O

Enzymlösung für Protoplastierung

1% (w/v) Cellulase Onozuka R-10, 0,2% (w/v) Maceroenzym R-10

Kathodenpuffer

20 mM Tris-HCl, 150 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS

Lösung W5

0,154 M NaCl, 0,125 M CaCl₂, 0,005 M KCl, 0,002 M MES, pH 5,7

Matrixlösung

5 mg/ml α -Cyanohydroxyzimtsäure, 0,1% (v/v) Trifluoressigsäure/Acetonitril (Verhältnis 35:65)

MMg-Lösung

0,4 M Mannitol, 0,015 M MgCl₂

MOPS (10 x)

200 mM MOPS, 50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA, pH 7,0

MS-GM

0,44% (w/v) Murashige & Skoog Minimalmedium, 3,05% (w/v) Saccharose, 3,05% (w/v) Mannitol, pH 5,5

MS-S

0,44% (w/v) Murashige & Skoog Minimalmedium, 0,28 M Saccharose, pH 5,5

PEG-Lösung

40% (w/v) Polyethylenglykol 4000, 0,2 M Mannitol, 0,1 M CaCl₂

Ponceau-Rot-Lösung

0,2% (w/v) Ponceau-Rot, 3% (w/v) Trichloressigsäure

Puffer A

0,5 M Saccharose, 0,05 M Tris, 0,005 M EDTA, 0,00175% (v/v) β -Mercaptoethanol, pH 7,5

Reextraktionspuffer

30% (w/v) Saccharose, 100 mM Tris, 100 mM KCl, 10 mM EDTA, pH 8,4, Zugabe von 400 μ l β -Mercaptoethanol kurz vor Anwendung

RNA-Ladepuffer

50% (v/v) Formamid, 3% (v/v) Glycerin, 16% (v/v) Formaldehyd, 4,5% (v/v) 10 x MOPS, 0,7% (w/v) Bromphenolblau

RNA-Lysepuffer

0,2 M Borsäure, 30 mM EDTA, 1% (w/v) SDS, pH 9,0

SDS-Laufpuffer (10 x)

0,5 M Tris, 3,46 M Glycin, 1% (w/v) SDS

SDS-Proteinpuffer (2 x)

150 mM Tris-HCl, 1% (w/v) SDS, 30% (v/v), 1,8% (w/v) Bromphenolblau, 15% (w/v) β -Mercaptoethanol, pH 6,8

“Shorty”-Puffer

200 mM Tris-HCl, pH 9,0, 400 mM LiCl, 1% (w/v) SDS, 0,935% (w/v) EDTA

TCM-Puffer

10 mM Tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM $CaCl_2$, pH 7,5

TBE (10 x)

1 M Borsäure, 20 mM EDTA, 1 M Tris-HCl, pH 8,3

TBS (10 x)

0,5 M Tris, 1,5 M NaCl, pH 7,8

TBST (10 x)

0,5 M Tris, 1,5 M NaCl, 0,5% Tween, pH 7,8

Trypsinlösung

0,1% (v/v) Trypsin, 4,875 mM NH_4HCO_3

2.1.9 Nährmedien

Luria-Bertani-Medium

1% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 0,5% (w/v) NaCl, pH 7,0-7,5; für Festmedium Zugabe von 2% (w/v) Agarose; für Selektion von Transformanten Zugabe von Ampicillin (50 mg/l) bzw. Kanamycin (50 mg/l), für „Blau-Weiß-Selektion“ Zugabe von X-Gal (40 mg/l) und 0,2 M IPTG

MSMO-Flüssigmedium

0,44% (w/v) Murashige & Skoog Minimalmedium, 3% (w/v) Saccharose, 0,5 mg/l NAA, 0,05 mg/l Kinetin, pH5,7

BMM-Medium

Maismehlextrakt aus 2,5% (w/v) Maismehl („Bio“-Qualität, über Nacht bei 65 °C quellen lassen, filtern), 3% (w/v) Malzextrakt, für Festmedium Zugabe von 2,5% (w/v) Agarose

½ MS + Saccharose-Medium

1% (w/v) Saccharose, 0,22% (w/v) Murashige & Skoog Minimalmedium (MS), 0,05% (w/v) MES, pH5,7, für Festmedium Zugabe von 0,8% (w/v) Agarose, für Selektion von Transformanten Zugabe von Kanamycin (50 mg/l)

2YT-Medium

1,6% (w/v) Trypton, 1% (w/v) Hefeextrakt, 0,5% (w/v) NaCl, pH 7,5, für Festmedium Zugabe von 1,5% (w/v) Agarose, für Selektion von Transformanten Zugabe von Gentamycin (25 mg/l), Kanamycin (50 mg/l), Rifampicin (50 mg/l)

SOC-Medium

2% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 2,5 mM KCl, 10 mM MgSO₄, 10 mM Laktose, pH 7,5

2.2 Methoden

Sämtliche in dieser Arbeit beschriebenen gentechnischen Arbeiten sind nach der Sicherheitsstufe 1 (S1/B1) des Gentechnikgesetzes und der Gentechnik-sicherheitsverordnung vom 01.07.1990 durchgeführt worden.

2.2.1 Kultur- und Anzuchtbedingungen

2.2.1.1 *Escherichia coli*

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte über Nacht bei 37 °C in LB-Flüssigmedium unter Schütteln bei 280 rpm (Minitron HT Infors Schüttler) oder auf LB-Festmedium.

2.2.1.2 *Agrobacterium tumefaciens*

Die Anzucht von *A. tumefaciens* erfolgte über Nacht bei 28 °C in 2YT-Flüssigmedium unter Schütteln bei 280 rpm (Minitron HT Infors Schüttler) oder auf 2YT-Festmedium.

2.2.1.3 *Arabidopsis thaliana*-Zellkulturen

Die Anzucht von *A. thaliana*-Zellkulturen erfolgte in MSMO-Flüssigmedium in 1 l oder 500 ml Erlenmeyerkolben. Die Subkultivierung erfolgte alle 7 Tage, indem frisches MSMO-Medium mit 1/10 Volumen der Kultur versetzt wurde.

2.2.1.4 *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen

Die Anzucht von *A. thaliana*-Pflanzen erfolgte in steriler Erde (TKS 2:3 feiner Sand, 2 Tage bei -80 °C zur Sterilisierung durchgefroren) in einer Klimakammer oder einem Klimaschrank (Percival Scientific, CLF Plant Climatics) bei 25 °C unter Langtagbedingungen (16 h Tag/8 h Nacht).

2.2.1.5 *Arabidopsis thaliana*-Keimlinge und putative Transformanten

Zur Anzucht von Keimlingen und zur Selektion putativer Transformanten wurden die Samen mittels zwei Lagen Mull von Pflanzenresten befreit. 10-20 mg der Samen wurden in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß (Sarstedt, Nürnberg) überführt und für eine Minute in 1 ml Ethanol p.a. bei 220 rpm geschüttelt (Minitron HT Infors Schüttler). Danach wurde der Ansatz für 1 min bei 15.300 rpm und Raumtemperatur abzentrifugiert (F2402-Rotor, Allegra

2IR, Beckman Coulter). Das Entfernen des Überstands sowie alle nachfolgenden Arbeitsschritte wurden unter einer Sterilbank (HeraSafe, Heraeus, Hanau) durchgeführt. Die Samen wurden in 1 ml Bleichlösung resuspendiert und für weitere 10 min geschüttelt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt unter den oben genannten Bedingungen wurde die Bleichlösung verworfen und die Samen viermal für 10 min in sterilem ddH₂O gewaschen. Anschließend wurden die Samen in 5 ml steriler 0,1% (w/v) Agarose aufgenommen und auf einer ½ MS + Saccharose-Medium (bei der Selektion von putativen Transformaten mit entsprechendem Antibiotikum) enthaltenden Petrischale (Ø 145 mm, Sarstedt, Nürnberg) ausgebracht. Nach Trocknung der Suspension wurde die Petrischale mit Parafilm (Pechiney Plastic Packaging, Menasha, Wisconsin, USA) versiegelt und zwecks Keimungssynchronisation für zwei Tage bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend erfolgte die Kultivierung im Klimaschrank (Percival, CLF Plant Climatics, Emersacker) bei 25 °C unter Langtagbedingungen. Putative Transformanten wurden nach sieben Tagen in Erde umgesetzt.

2.2.2 Durchführung der Hypoxie-Versuche

2.2.2.1 Inkubation im Anaerobenzelt

Eine sterile abgedunkelte Flasche (Schott, Mainz) wurde bis zum Rand mit der *A. thaliana*-Zellsuspension gefüllt. Die Flasche wurde zugeschraubt und in ein Anaerobenzelt (Coy Laboratory Products, Ann Arbor, Michigan, USA) eingeschleust. Anschließend wurde die Flasche aufgeschraubt und der Inhalt für 3 h einer N₂/CO₂-Atmosphäre ausgesetzt.

2.2.2.2 Flutungsversuche

Für Hypoxie-Versuche zur späteren Isolierung der Gesamt-RNA wurden 14 Tage alte in Erde angezogene *A. thaliana*-Pflanzen für 6 h komplett überflutet. Für phänotypische Analysen wurden 14 Tage alte in Erde angezogene *A. thaliana*-Pflanzen für vier Tage im Dunkeln komplett überflutet und anschließend unter Langtagbedingungen bis zur Samenreife weiter kultiviert.

2.2.2.3 Begasung durch N₂

Sieben Tage alte auf ½ MS + Saccharose-Medium angezogene *A. thaliana*-Keimlinge wurden in eine luftdicht abgeschlossene Glaskiste mit einem Ein- und Auslassventil überführt.

Hypoxie wurde durch Begasung mit N₂ durch das Einlaßventil erreicht. Der Sauerstoff wurde zusammen mit der übrigen Luft durch das Auslaßventil verdrängt. Die Inkubation wurde zwei Tage lang im Dunkeln bei 25 °C durchgeführt. Danach wurden die Pflanzen für fünf Tage bei Langtagbedingungen weiter kultiviert.

2.2.3 Isolierung von Mitochondrien und Protoplasten

2.2.3.1 Isolierung von Mitochondrien aus *Arabidopsis thaliana*-Zellkulturen und *Brassica oleracea* var. *botrytis*

Die Isolierung der Mitochondrien erfolgte nach Kempken et al., 2007 und Bolle et al., 2007. Abweichend von der dort beschriebenen Methode wurde dem Puffer A kein BSA zugefügt. Zur Verminderung plastidärer Kontaminationen wurde die Aufreinigung der Mitochondrien über einen diskontinuierlichen Saccharosegradienten zweimal durchgeführt.

2.2.3.2 Isolierung von Protoplasten aus *Arabidopsis thaliana*-Zellkulturen

Als Ausgangsmaterial dienten *A. thaliana*-Zellkulturen 7 Tage nach der letzten Subkultivierung. Sämtliche Zentrifugationsschritte fanden bei 1.000 rpm für 5 min bei Raumtemperatur statt (S4180-Rotor, Allegra 2IR, Beckman Coulter). Beschleunigung und Bremsen des Rotors wurden mit geringstmöglicher Geschwindigkeit durchgeführt, um ein Platzen der Protoplasten zu vermeiden. Die Osmolarität der verwendeten Lösungen wurde auf einen annähernd gleichen Wert eingestellt. 40 ml der Zellsuspension wurden in ein 50 ml Falcon™-Reaktionsgefäß (Sarstedt, Nürnberg) überführt und abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 25 ml Enzymlösung aufgenommen. Die Suspension wurde in zwei Petrischalen (Ø 145 mm, Sarstedt, Nürnberg) überführt, gefolgt von einer 3-5stündigen Inkubation bei 25 rpm (Celloshaker Variospeed) bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nach Verdau der Zellwand wurde die Protoplastensuspension in zwei 50 ml Falcon™-Reaktionsgefäßen abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde in jeweils 25 ml MS-GM resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes folgte die Resuspension in 10 ml MS-S. Die Protoplasten wurden in zwei 14 ml Reaktionsgefäße (Sarstedt, Nürnberg) überführt. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde der Überstand mit den darin schwebenden Protoplasten abgenommen und in ein neues 14 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die Suspension 1:1 mit Lösung W5 verdünnt.

und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und es erfolgte eine Resuspendierung der Protoplasten in 1,2 ml MMg-Lösung.

2.2.4 Herstellung kompetenter Bakterien

2.2.4.1 Herstellung elektrokompenter *Escherichia coli*-Zellen

Für die selektive Anzucht des *E. coli* (K12) XL1-Blue Stammes wurde mit 500 µl Stammkultur eine Vorkultur in 50 ml mit Tetrazyklin (12,5 mg/l) versetztem LB-Medium angeimpft. Diese wurde über Nacht bei 37 °C unter Schütteln (200 rpm) inkubiert. Am folgenden Tag wurde mit der Vorkultur 1%ig die Hauptkultur in 1 l ebenfalls mit Tetrazyklin (12,5 mg/l) versetztem LB-Medium angeimpft. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C unter Schütteln (220 rpm) bis zu einer optischen Dichte von OD₅₉₅ 0,5-0,6. Anschließend wurde die Kultur für 15 bis 30 min auf 4 °C abgekühlt und bei 4500 rpm (JLA16.250-Rotor, Avanti J-20 XP, Beckman Coulter) für 15 min bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 1 l 4 °C kaltem, sterilem Wasser aufgenommen. Die Zentrifugation wurde wiederholt und das Sediment mit 500 ml 4 °C kaltem, sterilem Wasser gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde das Sediment in 20 ml 4 °C kaltem, sterilem 10%igem (v/v) Glycerin aufgenommen. Es erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 5500 rpm (JA25.50-Rotor, Avanti J-20 XP, Beckman Coulter) für 15 min bei 4 °C. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 10%igem (v/v) Glycerin bis zu einem Endvolumen von 2-3 ml resuspendiert. Die elektrokompenten Zellen wurden in Aliquots von je 40 µl aufgeteilt und bis zum Gebrauch bei -80 °C gelagert.

2.2.4.2 Herstellung chemokompenter *Escherichia coli*-Zellen

Für die selektive Anzucht des *E. coli* (K12) XL1-Blue Stammes wurde mit 500 µl Stammkultur eine Vorkultur in 5 ml mit Tetrazyklin (12,5 mg/l) versetztem LB-Medium (siehe 2.1.9) angeimpft. Diese wurde über Nacht bei 37 °C unter Schütteln (200 rpm) inkubiert. Am folgenden Tag wurde mit der kompletten Vorkultur die Hauptkultur in 1 l ebenfalls mit Tetrazyklin (12,5 mg/l) versetztem LB-Medium angeimpft. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C unter Schütteln (220 rpm) bis zu einer optischen Dichte von OD₅₉₅ 0,6. Anschließend wurde die Kultur für 45 min auf 4 °C abgekühlt und bei 5000 rpm (JLA16.250-Rotor, Avanti J-20 XP, Beckman Coulter) für 10 min bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 200 ml 4 °C kaltem, sterilem 0,1 M MgCl₂

aufgenommen. Es erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 5000 rpm für 5 min bei 4 °C. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 200 ml kaltem, sterilem 0,1 M CaCl₂ aufgenommen. Es erfolgte eine 30 minütige Inkubation bei 4 °C. Nach einer Zentrifugation von 5 min bei 5000 rpm und 4 °C wurde das Sediment in 43 ml 4 °C kaltem, sterilem 0,1 M CaCl₂ resuspendiert und mit 7 ml sterilem Glycerin versetzt. Die chemokompetenten Zellen wurden in Aliquots von 500 µl aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zum Gebrauch bei -80 °C gelagert.

2.2.5 Molekularbiologische Methoden

2.2.5.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Kleinere Mengen Plasmid-DNA wurden aus 2,5 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur mit dem “NucleoSpin Plasmid Quick Pure”-Kit (Macherey & Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers isoliert. Größere Mengen Plasmid-DNA wurden aus 50 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur mit dem “NucleoBond PC 100”-Kit (Macherey & Nagel, Düren) nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt. Plasmide, die größer als 10 kb waren, ließen sich nicht über die im “NucleoSpin Plasmid Quick Pure”-Kit enthaltenden Silikatsäulen isolieren. Stattdessen wurde nach Fällung der Proteine 700 µl des Überstandes in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Es folgte die Zugabe von 500 µl Isopropanol und eine zehnminütige Fällung bei -20 °C. Danach wurde der Ansatz für 10 min bei 15.300 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Präzipitat mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Es erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 10 min bei 15.300 rpm und 4 °C. Der Überstand wurde verworfen. Nach Trocknung des Präzipitats wurde die Plasmid-DNA in 30 µl sterilem ddH₂O resuspendiert.

2.2.5.2 Isolierung von Gesamt-DNA aus Pflanzen und Zellkulturen

Die Isolierung von Gesamt-DNA erfolgte leicht abgewandelt nach Lecellier und Silar (1994). Das Pflanzenmaterial wurde in einem sterilen Mörser mit flüssigen Stickstoff zu einem feinen Pulver zerrieben und in ein steriles 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Zellkulturen wurden über einen Büchner-Trichter abgesaugt. Von den verbliebenen Zellen wurden 2,5 g in ein Sarstedt-Reaktionsgefäß überführt. Danach wurden 500 µl DNA-Lysepuffer und 500 µl Phenol zugegeben. Nach Durchmischung wurde der Ansatz für 5 min bei 14.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert (F2402-Rotor, Allegra 2IR, Beckman Coulter). Der Überstand

wurde abgenommen und mit 500 µl eines Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (25:24:1) ausgeschüttelt. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt von 5 min bei 14.000 rpm und Raumtemperatur. Nach einer Wiederholung der letzten beiden Schritte wurde der Überstand in ein neues steriles Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 5 µl RNase A (Roth, Karlsruhe) für 30 min bei 37 °C inkubiert. Es erfolgte die Zugabe von 500 µl eines Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (24:1). Der Ansatz wurde ausgeschüttelt und für 5 min bei 14.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Danach wurde der Überstand in ein neues steriles Reaktionsgefäß überführt und das Volumen bestimmt. Davon ausgehend wurden 1/10 Volumen 8 M Ammoniumacetat sowie 2 Volumen Ethanol, p.a. zugeben. Die Fällung der DNA erfolgte für 30 min bei -80 °C. Nach dieser Zeit wurde der Ansatz für 15 min bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment mit 70%igen Ethanol gewaschen. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 14.000 rpm und 4 °C wurde der Überstand verworfen und das Präzipitat nach kurzem Antrocknen in 50 µl 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 resuspendiert.

2.2.5.3 Isolierung von Gesamt-DNA aus Pflanzen („Shorty“-Methode)

Ein bis zwei Blätter wurden in ein steriles 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach der Zugabe von 500 µl „Shorty“-Puffer wurde das Pflanzenmaterial mit einem Plastikpistill zerrieben, bis sich der Puffer grün verfärbte. Danach erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 5 min bei 15.300 rpm und 4 °C (F2402-Rotor, Allegra 2IR, Beckman Coulter). 350 µl des Überstandes wurden mit der gleichen Menge an Isopropanol versetzt, gemischt und bei -20 °C über Nacht gefällt. Anschließend wurde der Ansatz für 10 min bei 15.300 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Präzipitat nach kurzem Antrocknen in 200 µl sterilem ddH₂O resuspendiert.

2.2.5.4 Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzen und Zellkulturen

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzen wurde abgewandelt nach Hoge et al. (1982) durchgeführt. Das Pflanzenmaterial wurde in einem sterilen Mörser mit flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zerrieben und in ein steriles 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Zellkulturen wurden über einen Büchner-Trichter abgesaugt. Von den verbliebenen Zellen wurden 2,5 g in ein Sarstedt-Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 500 µl kochendem RNA-Lysepuffer wurden die Pflanzenzellen aufgeschlossen und direkt danach mit 500 µl auf 60 °C erwärmtem Phenol versetzt. Der Ansatz wurde durchmischt und für 10 min bei 14.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert (F2402-Rotor, Allegra 2IR, Beckman

Coulter). Der Überstand wurde abgenommen und mit 500 µl eines Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemischs (25:24:1) ausgeschüttelt. Danach erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 5 min bei 14.000 rpm und Raumtemperatur. Nach Wiederholung der letzten beiden Schritte wurde der Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit einem Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (24:1) ausgeschüttelt. Im Anschluss an eine weitere 5minütige Zentrifugation bei 14.000 rpm und Raumtemperatur wurde der Überstand abgenommen und das Volumen bestimmt. Zur Fällung der Nukleinsäuren wurden 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat und 2 Volumen an Ethanol p.a. zugegeben. Der Ansatz wurde 30 min bei -80 °C inkubiert. Anschließend erfolgte ein 15minütiger Zentrifugationsschritt bei 14.000 rpm und 4 °C. Nach Dekantierung des Überstandes wurde das Präzipitat mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen und nach kurzem Antrocknen in 700 µl sterilem ddH₂O (DEPC-behandelt) aufgenommen. Nach der Resuspendierung wurden dem Ansatz 700 µl 4 M LiCl zugegeben. Die Fällung der RNA erfolgte über Nacht bei 4 °C. Die ausgefallene RNA wurde für 15 min bei 15.000 rpm und 4 °C abzentrifugiert, mit 70%igem Ethanol gewaschen und nach kurzem Antrocknen in 40 µl sterilem ddH₂O (DEPC-behandelt) resuspendiert.

2.2.5.5 Synthese von cDNA aus Gesamt-RNA

Zur cDNA-Synthese wurde das RevertAid™ Premium First Strand Synthesis Kit (Fermentas, Leon-Rot) verwendet. Als Ausgangsmaterial wurden 1 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.2.5.6 Standard-Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion wurde verändert nach Saiki et al. (1988) und Kawasaki und Wang (1989) durchgeführt. Zur Amplifizierung von Gesamt-DNA wurden 10-1000 ng, für Plasmid-DNA 0,1-15 ng eingesetzt. Der Standard-PCR-Ansatz enthielt 1 x PCR-Puffer (mit 1,5-2 mM MgCl₂ als Endkonzentration), 10 mM je dNTP, 5 pmol je Oligonukleotid, 1,25 Units Moltaq-Polymerase und 0,5 µl vom Hersteller gestellten Enhancer (Zusammensetzung nicht bekannt) sowie steriles ddH₂O in einem Endvolumen von 50 µl. Für die Amplifizierung von für Klonierungen vorgesehenen DNA-Fragmenten wurde die *Pwo*-DNA-Polymerase (Pqlab, Erlangen) aufgrund ihrer 3'-5' Exonuklease-Aktivität („Proofreading“-Funktion) eingesetzt. Die Menge an zu amplifizierender Gesamt-DNA betrug 100-750 ng. Der Ansatz enthielt 25 pmol pro Oligonukleotid sowie 2,5 Units der *Pwo*-DNA-Polymerase. Die

eingesetzten Mengen an dNTPs und Puffer und das Endvolumen von 50 µl blieben gleich. Ein Enhancer wurde nicht verwendet. Bei den verwendeten PCR-Geräten handelte es sich um den „PTC-100™“ (MJ Research, Inc., Hess. Oldendorf), den „Minicycler“ (MJ Research, Inc., Hess. Oldendorf) und den „Mastercycler Gradient“ (Eppendorf, Hamburg). Zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten mittels MolTaq-DNA-Polymerase wurde eine Anfangs-Denaturierung von 2 min bei 94 °C durchgeführt. Es folgten 45 Zyklen einminütiger Denaturierung bei 94 °C, 1 min Inkubation bei 55-65 °C zur Anlagerung der Oligonukleotide an die DNA (die Temperatur variierte in Abhängigkeit der verwendeten Oligonukleotide) und der Elongation bei 72 °C (1 min/1000 bp). Außerdem wurde ein einmaliger abschließender Elongationsschritt von 5 min bei 72 °C durchgeführt. Bei der Verwendung von *Pwo*-DNA-Polymerase betrug die Dauer der Denaturierung 15 s und die Dauer des Anlagerungsschritts 30 s. Die Elongation fand bei 68 °C statt. Dauer und Temperatur der Eingangsdenaturierung und Anzahl der Zyklen entsprachen den Angaben des MolTaq-Protokolls. Die Endelongation wurde für 7 min bei 68 °C durchgeführt. Bei der Verwendung von Oligonukleotiden mit Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen wurden zunächst drei bis sechs Zyklen mit einer für die Oligonukleotide ohne Erkennungssequenzen optimalen Anlagerungstemperatur durchgeführt. Anschließend folgten 39-42 Zyklen mit einer Anlagerungstemperatur optimal für die Oligonukleotide mit Erkennungssequenz.

2.2.5.7 Reverse-Transkription-PCR („OneStep“ RT-PCR)

Die cDNA-Amplifizierung aus Gesamt-RNA erfolgte mit dem „OneStep“ RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers. Zur Entfernung von DNA-Rückständen wurde die RNA mit einer RNase-freien DNase I (Fermentas, Leon-Rot) behandelt. Der vollständige Abbau der DNA wurde in einer PCR mit spezifischen Oligonukleotiden überprüft.

2.2.5.8 Quantitative Real Time PCR

Die Stärke der Genexpression wurde mittels quantitativer Real Time PCR ermittelt. Die Amplifizierung aus Gesamt-RNA erfolgte mit dem QuantiTect™ SYBR® Green RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden). Die in den Angaben des Herstellers genannten Komponenten wurden auf eine Gesamtmenge von 25 µl/Reaktion reduziert. Als Matrize wurden pro Reaktion 50 ng DNA-freie Gesamt-RNA eingesetzt. Vor jedem Lauf wurden die entsprechenden Oligonukleotide auf eine korrekte Amplifizierung des gewünschten Produkts anhand von genomischer DNA als Matrize untersucht. Die reverse Transkription sowie die

Amplifizierung der cDNA wurde mit dem „7300 Real Time PCR System“ (Applied Biosystems, Darmstadt) nach folgendem Programm durchgeführt:

Programm der quantitativen Real Time PCR

- 1) Reverse Transkription der Ausgangs-RNA bei 50 °C für 30 min
 - 2) Inaktivierung der Reversen Transkriptase und Aktivierung der HotStarTaq DNA Polymerase bei 95 °C für 15 min
 - 3) Denaturierung der cDNA bei 95 °C für 15 s
 - 4) Anlagerung der Oligonukleotide bei 55 °C für 1 min
 - 5) Elongation bei 72 °C für 30 s, Sammeln der Daten
- } 40 Zyklen

Nach jedem Lauf erfolgte eine Berechnung der Schmelzkurve zur Spezifizierung des Amplifikats. Der Schwellenwert (Ct), welcher den Zyklus definiert, bei dem das Fluoreszenzsignal die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt, wurde mit dem Programm „7300 System Sequence Detection Software, Version 1.3 (Applied Biosystems, Darmstadt) ermittelt. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit demselben Programm. Die relativen Änderungen der Expressionsrate wurden mit der um die Effizienz der Oligonukleotide erweiterte Formel: relative Expressionsänderung = $2^{-\Delta\Delta C_t}$ berechnet (Pfaffl, 2004). Sämtliche Experimente wurden zur Reproduzierbarkeit der Ergebnisse dreimal wiederholt.

2.2.5.9 Gelelektrophorese von DNA

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA wurde auf 1%igen Agarosegelen in 1 x TBE-Puffer durchgeführt. Der Agarose wurden zum Anfärben der DNA 0,3 mg/ml Ethidiumbromid zugegeben. Die DNA wurde zu 20% mit Ladepuffer versetzt. Als Größenstandard diente ein 100-5000 bp-Marker (MBBL, Bielefeld) oder mit *HindIII* hydrolysierte λ -DNA (MBBL, Bielefeld).

2.2.5.10 Gelelektrophorese von RNA

Die elektrophoretische Auftrennung von RNA wurde auf 1,2%igen Formaldehyd-Agarosegeln in 1 x MOPS-Puffer durchgeführt. Vor dem Auftrag auf das Gel wurde die RNA

mit Ladepuffer versetzt und zur Auflösung der Sekundärstrukturen für 10 min bei 65 °C inkubiert.

2.2.5.11 Gelelution von DNA

Die Elution von DNA aus Agarosegelen erfolgte mit dem „NucleoSpin Extract II“-Kit von Macherey & Nagel (Düren) nach Angaben des Herstellers.

2.2.5.12 Reinigung von DNA mittels Filterblattdialyse

In eine Petrischale wurden 10 ml ddH₂O gegeben und ein Cellulose-Membranfilter mit einer Porengröße von 0,025 µm (Millipore, Schwalbach) auf die Wasseroberfläche aufgelegt. Anschließend wurde die zu reinigende DNA auf die Oberseite des Filters aufgetragen und für 30 min dialysiert.

2.2.5.13 Reinigung von DNA mittels Ethanolfällung

Dem Ansatz wurden 1/10 Volumen 8 M Ammoniumacetat und 2 Volumen Ethanol p.a. zugegeben. Die Präzipitation der DNA erfolgte für 10 min bei -80 °C. Danach wurde der Ansatz auf Raumtemperatur erwärmt und die Fällung wiederholt. Anschließend erfolgte eine 5minütige Zentrifugation bei Raumtemperatur und 15.300 rpm (F2402-Rotor, Allegra 21R, Beckman Coulter). Nach der Dekantierung des Überstandes wurde die ausgefällte DNA angetrocknet und in 20 µl sterilem ddH₂O aufgenommen.

2.2.5.14 Hydrolyse von DNA

Die Hydrolyse von DNA mittels Restriktionsendonukleasen erfolgte in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer nach Sambrook et al. (1989).

2.2.5.15 Dephosphorylierung von DNA

Für die Dephosphorylierung von hydrolisierter Vektor-DNA vor Ligationen (ausgenommen waren Klonierungen von PCR-Fragmenten) wurde das Enzym „Antarctic Phosphatase“ nach Angaben des Herstellers verwendet (New England Biolabs, Frankfurt am Main).

2.2.5.16 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde mit Hilfe des Enzyms „T4-DNA-Ligase“ (New England Biolabs, Frankfurt am Main) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.5.17 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von Plasmiden wurde im Institut für Innere Medizin I des Universitätsklinikums Schleswig-Holsteins nach der Didesoxy-Methode nach Sanger (1977) durchgeführt.

2.2.5.18 Erstellung der GUS-Reportergenkonstrukte

Aus genomischer DNA von Zellkulturen der Linie MM1 wurde ein 2 kb großes Fragment der Promotorregion von *ATHSP23.6-mito*, *ATHSP26.3-mito*, *ATHSP22-mito*, *ATIDD14*, *PHL*, *CML38* und *AOX1a* stromaufwärts des Startkodons amplifiziert. Über spezifische Oligonukleotide wurde am 5'-Ende und am 3'-Ende Schnittstellen für die Restriktionsendonuklease *PacI* bzw. *AscI* eingefügt. Die Promotorregion des Gens *ATHSP22-mito* wurde am 5'-Ende mit einer Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease *ClaI* versehen, da *PacI* innerhalb der Sequenz schneidet. Das *gusA*-Gen wurde aus dem Plasmid pNW492 amplifiziert, wobei am 5'-Ende und am 3'-Ende Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *BlnI* und *AscI* bzw. *BamHI* eingefügt wurden. Die Fragmente wurden nach Auftrennung der PCR-Proben auf einem 1 %igen Agarosegel ausgeschnitten und eluiert. Die isolierten und aufgereinigten Fragmente wurden in den Vektor pSK+ zwischenkloniert und in elektrokompetente *E. coli*-Zellen eingebracht. Nach Isolierung der Plasmid-DNA aus positiven Transformanten wurden die Fragmente mit den oben aufgeführten Restriktionsendonukleasen ausgeschnitten und zusammen mit dem auf gleiche Weise isolierten *gusA*-Gen in den T-DNA-Klonierungsvektor pHS594 ligiert (Schema siehe Abbildung 3.5). Die Integration des *gusA*-Gens und des jeweiligen Promotorfragments wurde durch eine Hydrolyse mit geeigneten Restriktionsendonuklasen sowie durch PCR nachgewiesen. Die vollständigen Plasmidkarten sind im Anhang dieser Arbeit aufgeführt.

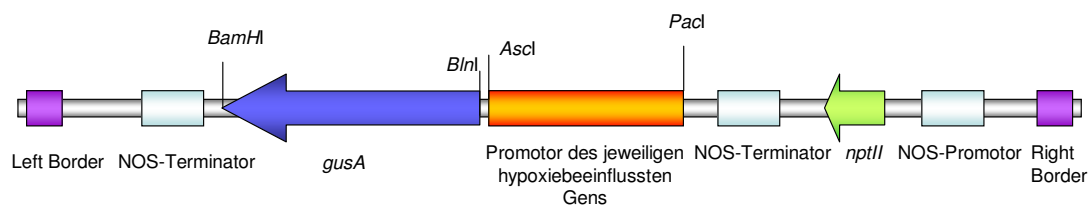


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der T-DNA-Region des GUS-Reportergenkonstrukts.

Als Basisvektor wurde das für *Floral Dip*-Transformation von *A. thaliana* geeignete Plasmid pHS594 verwendet. Hinter der *right border*-Sequenz befindet sich das Gen für Neomycin-Phosphotransferase (*nptII*) unter der Kontrolle des Promotors und der Terminatorregion des Nopalin-Synthase-Gens (*NOS*) von *A. tumefaciens*, welches dem transformierten Organismus eine Resistenz gegen Kanamycin verleiht. Danach folgt das über die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *PacI* und *AscI* eingefügte Promotorfragment des jeweiligen hypoxiebeeinflussten Gens. Hinter die Promotorsequenz wurde über die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *AscI* und *BamHI* das Gen für β -Glukuronidase (*gusA*) aus *E. coli* kloniert. Abschließend folgt eine weitere NOS-Terminatorregion sowie die *left border*-Sequenz der T-DNA. Die vollständigen Plasmidkarten sind im Anhang aufgeführt.

2.2.5.19 Erstellung der GFP-Fusionskonstrukte

Aus *A. thaliana* Wildtyp-cDNA wurde ein ca. 700 bp großes, möglicherweise mitochondriale Importsequenzen enthaltendes Fragment der Gene *ATHSP26.3-mito*, *ATIDD14*, *CML38*, *PHL*, *ATHSP23.6-mito*, *ATHSP22-mito* und *CPK22* amplifiziert. Über spezifische Oligonukleotide wurde am 5'-Ende und am 3'-Ende Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *KpnI* bzw. *SalI* eingefügt. Nach Auftrennung der PCR-Proben auf einem 1%igen Agarosegel wurden die Fragmente ausgeschnitten und aus dem Gel eluiert. Es erfolgte eine Zwischenklonierung in den Vektor pSK+ und eine Überprüfung der korrekten Amplifizierung mittels Sequenzierung. Die Fragmente wurden durch Hydrolyse mit den oben aufgeführten Restriktionsendonukleasen aus dem Vektor pSK+ entfernt und in den GFP-Expressionsvektor pOL-GFPS65C (Peeters et al., 2000) kloniert (Schema siehe Abbildung 3.10). Die korrekte Integration des jeweiligen Fragments in den Vektor pOL-GFPS65C wurde durch eine Hydrolyse des entsprechenden Plasmids mit geeigneten Restriktionsendonuklasen sowie durch Sequenzierung nachgewiesen.

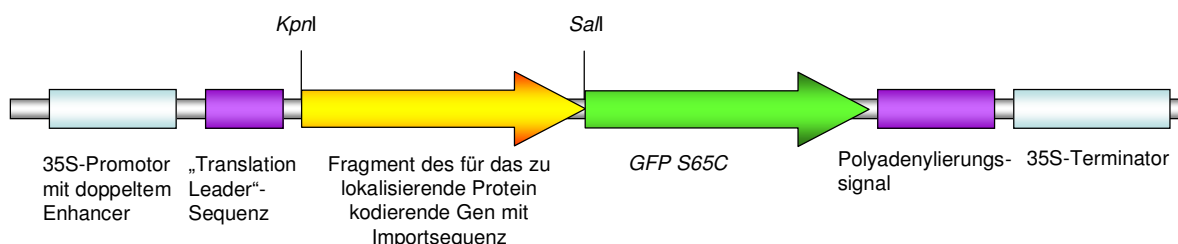


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des GFP-Reportergenkonstrukts.

Als Basisvektor wurde das für transiente Transformationen geeignete Plasmid pOL-GFPS65C verwendet (Peeters et al., 2000). Hinter dem 35S-Promotor mit doppeltem Enhancer des Tabakmosaikvirus befindet sich die translation leader-Sequenz aus dem Tabakmosaikvirus. Hinter die Promotorsequenz wurde über die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *KpnI* und *SalI* die jeweilige Präsequenz kloniert. Auf demselben Leserahmen liegend schließt sich das für GFPS65C kodierende Gen an. Abschließend folgt ein Polyadenylierungssignal sowie die 35S-Terminatorsequenz (beide aus dem Tabakmosaikvirus). Nicht gezeigt ist das Gen für β -Lactamase (Ampicillin-Resistenz). Vollständige Plasmidkarten konnten nicht erstellt werden, da nur der in dieser Abbildung schematisch gezeigte Abschnitt des Plasmids sequenziert wurde. Der entsprechende Teilbereich mit den jeweiligen Präsequenzen ist im Anhang der Arbeit aufgeführt.

2.2.5.20 Elektroporation von *Escherichia coli* und *Agrobacterium tumefaciens*

Elektrokompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 50-200 ng Plasmid oder 3 μ l eines zuvor aufgereinigten Ligationansatzes vereinigt. Nach einer Inkubation bei 4 °C für 30 s wurden die Zellen in eine Elektroporationsküvette mit einer Spaltbreite von 2 mm (BioRad, München) überführt und in das Elektroporationsgerät eingesetzt (Gene Pulser II, BioRad, München). Die Transformation erfolgte bei einer Feldstärke von 2,5 kV/cm, einem Widerstand von 200 Ω und einer Kapazität von 25 μ F. Direkt im Anschluss wurden *E. coli*-Zellen mit 1 ml SOC-Medium versetzt. Nach einer Inkubation von 10 min bei

Raumtemperatur wurden 30-50 µl des Transformationsansatzes auf dem jeweiligen Selektionsmedium ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Putative positive Klone besaßen nach erfolgreicher Transformation das Plasmid mit dem entsprechenden Resistenzgen oder konnten zusätzlich noch durch sogenannte “Blau-Weiß-Selektion” auf Tetrazyklin-, Ampicillin-, X-Gal- und IPTG-haltigem Medium identifiziert werden. *A. tumefaciens* wurde nach der Elektroporation mit ml 2YT-Medium versetzt. Der Ansatz wurde in ein steriles Reagenzglas überführt und für 6-8 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 80-100 µl des Ansatzes auf dem jeweiligen Selektionsmedium ausgestrichen und für zwei Tage bei 28 °C inkubiert.

2.2.5.21 Transformation von *Escherichia coli* mit CaCl₂

Für die Anreicherung von Plasmiden > 10 kb wurden chemokompetente *E. coli*-Zellen transformiert. Diese wurden auf Eis aufgetaut. 100 µl der Zellen wurden mit 10 µl des ungereinigten Ligationsansatzes und 50 µl TCM-Puffer vereinigt. Nach einer Inkubation von 30 min bei 4 °C erfolgte ein einminütiger Hitzeschock bei 43 °C. Sofort im Anschluss wurde der Transformationsansatz für 2 min auf Eis inkubiert. Danach wurden 500 µl auf 37 °C vorgewärmtes LB-Medium zugegeben und der Ansatz für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 100-200 µl des Ansatzes auf dem jeweiligen Selektionsmedium ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.5.22 Transformation von *Arabidopsis thaliana*-Protoplasten mittels Polyethylenglykol

15-30 µg des jeweiligen Plasmids (Konzentration 1 mg/ml) wurden in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit rundem Boden gegeben. Nach Zugabe von 200 µl Protoplastensuspension folgte eine vorsichtige Durchmischung. Im Anschluss wurden 220 µl PEG-Lösung hinzugefügt und die Probe erneut durchmischt. Danach wurde der Ansatz für 10-20 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 800 µl Lösung W5 hinzugegeben. Nach dem Durchmischen des Ansatzes wurde dieser bei 500 rpm für 3 min bei Raumtemperatur zentrifugiert (F2402-Rotor, Allegra 2IR, Beckman Coulter). Beschleunigung und Bremsen des Rotors wurden mit geringstmöglicher Geschwindigkeit durchgeführt, um ein Platzen der Protoplasten zu vermeiden. Der Überstand wurde abgenommen und das Sediment mit 500 µl MS-GM versetzt. Der Transformationsansatz wurde bei 22-26 °C im Dunkeln für 10 h inkubiert.

2.2.5.23 Transformation von *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen

Die Transformation von *A. thaliana*-Wildtyp-Pflanzen erfolgte mit der *Floral Dip*-Methode nach Clough et al., 2005.

2.2.6 Methoden zur Proteinanalyse

2.2.6.1 Extrahierung von mitochondrialem Gesamtprotein

Nach einem 2 x 5minütiger Aufschluss der Organellen im Ultraschallbad wurde die Suspension für 15 min bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert (F2402-Rotor, Allegra 2IR, Beckman Coulter). Der Überstand wurde mit 400 µl Phenol versetzt. Nach einer Durchmischung des Ansatzes erfolgte eine weitere Zentrifugation für 10 min bei 7.500 rpm und Raumtemperatur. Die phenolhaltige Phase wurde abgenommen und mit 400 µl Reextraktionspuffer versetzt. Anschließend wurde der Ansatz durchmischt und erneut zentrifugiert. Nach dreimaliger Wiederholung der letzten beiden Schritte wurden der phenolhaltigen Phase 800 µl -20 °C kaltes Aceton zugegeben. Die Fällung der Proteine erfolgte über Nacht bei -20 °C. Daraufhin wurde der Ansatz für 15 min bei 15.300 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Präzipitat wurde mit 800 µl Aceton gewaschen und für 5 min bei 15.300 rpm und 4 °C zentrifugiert. Nach einer Wiederholung der letzten beiden Schritte wurde der Überstand verworfen und das Präzipitat getrocknet. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

2.2.6.2 Denaturierende Gelelektrophorese von Proteinen

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde unter denaturierenden Bedingungen leicht abgewandelt nach Lämmli (1970) durchgeführt. Sämtliche Proteinproben wurden vor dem Gelauftrag mit 20 µl SDS-Probenpuffer versetzt und für 10 min bei 95 °C denaturiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einem 5%igen Sammelgel (5% (v/v) Acrylamid/N,N-Methylenbisacrylamid 37,5:1, 0,1% (w/v) SDS, 0,05% APS, 60 mM Tris-HCl, pH 6,8, 84% (v/v) ddH₂O, 0,08% (v/v) TEMED) und einem 10%igen Trenngel (10% (v/v) Acrylamid/N,N-Methylenbisacrylamid 37,5:1, 0,1% (w/v) SDS, 0,05% APS, 0,7 M Tris-HCl, pH 8,8, 0,2% (v/v) TEMED, 62% (v/v) ddH₂O) in einer vertikalen Elektrophoresekammer (P8DS-Elektrophoresekammer, Emperor Penguin, Portsmouth, England). Als Größenstandard wurde der Marker P77085 (New England Biolabs, Frankfurt am Main) verwendet.

2.2.6.3 Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Die Polyacrylamidgele wurden für 45 min in Coomassie-Färbelösung inkubiert. Die Entfärbung erfolgte für 2 h mit Entfärbelösung, gefolgt von einem weiteren Entfärbeschritt in ddH₂O über Nacht, bis die Proteinspots oder -banden deutlich erkennbar waren.

2.2.6.4 Western Blot

Nach der Entfernung des Sammelgels wurde das die Proteine enthaltende Trenngel ausgemessen und in Kathodenpuffer transferiert. Ein Stück Nitrozellulosemembran sowie sechs Stücke Whatman-Papier und zwei Stücke Schwammtuch wurden auf dieselbe Größe wie das Trenngel zurechtgeschnitten. Die Nitrozellulosemembran wurde in ddH₂O geschwenkt und in den Anodenpuffer überführt. Auf die Anode der „Semi-Dry-Blot“-Apparatur (VWR, Darmstadt) wurden eine Lage Schwammtuch und drei Lagen Whatman-Papier gelegt. Beide Komponenten waren zuvor in Anodenpuffer getränkt worden. Auf diese wurde die Nitrozellulosemembran gefolgt von dem die zu blottenden Proteine enthaltenden Polyacrylamidgel gelegt. Es folgten drei Lagen Whatman-Papier und eine Lage Schwammtuch, die vorher in Kathodenpuffer getränkt worden waren sowie die Kathode des Geräts. Eventuelle Luftblasen wurden durch Rollen mit einer Glaspipette entfernt. Der Transfer der Proteine erfolgte bei 4 °C bei 0,65 mA/cm² für 1,5 h bis 2,5 h. Die Membran wurde zur Visualisierung der Proteine für 10 min in Ponceau-Rot-Lösung geschwenkt. Anschließend wurden die Banden des Proteinmarkers markiert und die Membran in ddH₂O entfärbt.

2.2.6.5 Detektionsverfahren für die Western Blot-Analyse

Die Blockierung der freien Bindestellen erfolgte in 4%iger Milchpulverlösung für zwei Stunden bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Membran 6 x 10 min in 1 x TBST gewaschen. Daraufhin erfolgte die Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper (Verdünnung 1:1000 in 4%iger Milchpulverlösung) für 1 h bei 4 °C unter leichtem Schütteln. Unspezifisch gebundener Antikörper wurde durch zwei 10minütige Waschschrte in 1 x TBS und einen 10minütigen Waschschrte in 1 x TBST entfernt. Im Anschluss erfolgte die Inkubation der Membran mit dem gegen Kaninchen gerichteten Sekundärantikörper (Verdünnung 1:3000 in 10%iger Milchpulverlösung in 1 x TBST) für 2 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln. In zwei 10minütigen Waschschrten in 1 x TBS + Tween/Triton und einem 10minütigen Waschschrte in 1 x TBST wurde unspezifisch gebundener Antikörper entfernt. Zur Detektion mittels erweiterter Chemolumineszenz

(Enhanced Chemoluminescence, ECL) wurden 0,5 ml Lösung A und 0,5 ml Lösung B (Roche, Mannheim) gemischt und auf die Membran gegeben. Anschließend erfolgte eine Exposition der Membran für 1 bis 10 min auf Konica Minolta-Röntgenfilmen (Hohenbrunn). Die Entwicklung der Filme wurde mit der Curix 60-Entwicklermaschine (Agfa, Köln) durchgeführt.

2.2.6.6 Zweidimensionale Gelelektrophorese von Proteinen

Die elektrophoretische Auftrennung der Peptide anhand ihres isoelektrischen Punktes und ihrer Größe wurde mit den Geräten „Ettan IPGphor“ und „Ettan DALTsix“ (GE Healthcare, München) nach den Anleitungen im Handbuch des Herstellers unter Verwendung der dort angegebenen Lösungen durchgeführt.

2.2.6.7 Probenvorbereitung für MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometrie

Zur Vermeidung der Kontamination mit Fremdproteinen wurden alle Arbeitsschritte mit Laborhandschuhen durchgeführt. Das durch Coomassie-Färbung visualisierte Protein wurde aus dem Polyacrylamidgel ausgestochen und in ein 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Das Gelfragment wurde 3 x 5 min mit 500 µl ddH₂O gewaschen. Nach Zugabe von 100 µl von Acetonitril/250 mM NH₄HCO₃ (Verhältnis 1:1) wurde der Ansatz vorsichtig gemischt. Der Überstand wurde nach Absetzung des Gelfragments am Boden des Reaktionsgefäßes verworfen. Nach Zugabe von 100 µl Acetonitril erfolgte eine 2minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Danach wurde das Gelfragment im Vakuumkonzentrator (Univapo 100 H, UniEquip, Martinsried) getrocknet. Nach Zugabe von 10 µl einer frisch angesetzten Trypsinlösung wurde das Gelfragment bei 4 °C für 30 min inkubiert und mit 10 µl 5 mM NH₄HCO₃ versetzt. Die proteolytische Spaltung des Proteins erfolgte über Nacht bei 37 °C. Am folgenden Tag wurde der Ansatz für 1 min bei 13.000 x g abzentrifugiert (F2402-Rotor, Allegra 2IR, Beckman Coulter) und der Überstand verworfen. Durch Zugabe von 25 µl 0,3% (v/v) Trichloressigsäure/Acetonitril wurde die proteolytische Spaltung gestoppt und das Peptid aus dem Gelstück eluiert. Nach einer 10minütigen Behandlung im Ultraschall-Wasserbad wurde der Ansatz für 10 min bei 25 °C und 500 rpm geschüttelt (Thermomixer Comfort, Eppendorf, Hamburg). Es folgte eine einminütige Zentrifugation bei 13.000 x g und Raumtemperatur. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das zurückgebliebene Gelfragment wurde mit 20 µl Acetonitril versetzt und erneut für 10 min im Ultraschallbad inkubiert. Nach einer einminütigen Zentrifugation bei 13.000 x g erfolgte eine Vereinigung der Überstände. Das Volumen des Ansatzes wurde im

Vakuumkonzentrator bis zur fast vollständigen Trocknung reduziert. Anschließend wurden 8 µl 0,1% (v/v) Trifluoressigsäure/5% (v/v) Acetonitril zugegeben und die Peptidlösung für 10 min mit Ultraschall behandelt. Zur Entsalzung der Peptide erfolgte eine dreimalige Waschung in PerfectPure™ C-18 Tips (Eppendorf, Hamburg) mit 0,1 (v/v) Trifluoressigsäure. Die Elution erfolgte mit 0,5µl Matrixlösung direkt auf die MALDI-Platte.

2.2.7 Histochemische und physiologische Methoden

2.2.7.1 Färbung von pflanzlichen Mitochondrien

Mitochondrien wurden mit dem spezifischen Farbstoff MitoTracker® Orange CM-H₂TMRos (Invitrogen) in einer Endkonzentration von 500 nM gefärbt. Nach 15-45minütiger Inkubation bei Raumtemperatur folgte eine Analyse am konfokalen Laserscanningmikroskop (TCS SP5, Leica, Wetzlar) bei einer Anregung von 554 nm und einer Emission von 576 nm.

2.2.7.2 GUS-Färbung von pflanzlichem Gewebe

Der Nachweis der β-Glukuronidase-Aktivität wurde nach Jefferson et al., 1987 durchgeführt. Das in den Blättern enthaltene Chlorophyll wurde durch eine Entfärbereihe mit 50% (v/v) Ethanol, 70% (v/v) Ethanol und 99% (v/v) Ethanol entfernt.

2.2.7.3 Untersuchung der Stomata

Die Unterseite der Blätter wurde mit transparentem Nagellack bestrichen. Nach dessen Trocknung wurde die Nagellackschicht vorsichtig abgezogen und auf einen Objektträger aufgebracht. Analyse und Dokumentation erfolgten im Hellfeld bei 20facher Vergrößerung an einem Lichtmikroskop vom Typ Axiophot (Carl Zeiss AG, Göttingen).

2.2.7.4 Untersuchung der Pollenvitalität

Die Untersuchung der Pollenvitalität erfolgte nach Alexander (1969). Analyse und Dokumentation erfolgten im Hellfeld bei 20facher Vergrößerung an einem Lichtmikroskop vom Typ Axiophot (Carl Zeiss AG, Göttingen).

2.2.8 In dieser Arbeit verwendete Software und Datenbankrecherchen

Microarray-Daten wurden mit dem Programm *Genevestigator* (<https://www.genevestigator.com/gv/index.jsp>; Zimmermann et al., 2004) analysiert. *In silico* Expressionstudien der Entwicklung und Gewebespezifität wurden mit dem *Arabidopsis eFP-Browser* (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>; Winter et al., 2007) durchgeführt. Oligonukleotide für die quantitative Real Time PCR wurden mit dem Programm *Primer Express Version 3.0* (Applied Biosystems, 2004) erstellt. Oligonukleotide zur Untersuchung der SALK-Linien wurden mit dem Programm *SIGnAL iSect Primer Design* (SIGnAL, 2000-2010) ermittelt. Alle anderen Oligonukleotide wurden mit dem Programm *Clone Manager 9 Professional Edition* (Scientific & Educational Software, 1994-2007) generiert. Sequenzvergleiche von DNA erfolgten mit dem Programm *ClustalW* (www.ebi.ac.uk/clustalw/; Thompson et al., 1994; Larkin et al., 2007). Zum Abgleich von DNA-Sequenzen mit Nukleotidatenbanken wurden die Programme *BLAST* (www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi; Altschul et al., 1990) und *FASTa* (www.ebi.ac.uk/Tools/fasta33/nucleotide.html; Pearson und Lipman, 1989) verwendet. Vorhersagen der subzellulären Lokalisation wurden mit den Programmen *TargetP* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>; Emanuelsson, 2000), *WolfPsort* (<http://wolfpsort.org/>; Horton et al., 2006), *SubLoc* (<http://www.bioinfo.tsinghua.edu.cn/SubLoc/>; Hua und Sun, 2001), *Mitoprot2* (<http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>; Claros und Vincens, 1996) und *Predotar* (<http://urgi.versailles.inra.fr/predotar/predotar.html>; Small et al., 2004) durchgeführt. Der Verwandtschaftsgrad von Proteinen wurde mit dem Programm *EMBOSS* (<http://emboss.sourceforge.net/>; Rice et al., 2000) bestimmt. Abgleiche von Peptidsequenzen aus massenspektrometrischen Analysen mit Proteindatenbanken erfolgten mit dem Programm *Mascot* (Perkins et al., 1999). Für Bilddokumentationen und -bearbeitung wurden die Programme *Cell^F* (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster) und *Photoshop* (Adobe Systems Inc., San Jose, Kalifornien, USA) verwendet. Zur statistischen Absicherung wurden Student's t-Tests mit dem Programm *R* (R Foundation for Statistical Computing, Wien, Österreich) erstellt. Es wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $P < 0,05$ angenommen.

3 Ergebnisse

In der folgenden Arbeit wurde die Anpassung pflanzlicher Mitochondrien an hypoxische Bedingungen mittels retrograder Regulierung anhand der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* auf DNA- und Proteinebene untersucht. Da Anoxie die mitochondrielle Struktur verändert (Vartapetian et al., 2003), wurde ein möglicherweise ähnlicher Einfluss von Hypoxie analysiert. Weiterhin wurden mittels bioinformatischer Methoden, quantitativer Real Time PCR, GFP-Fusionskonstrukten und Analysen des mitochondrialen Proteoms hypoxiebeeinflusste nukleär kodierte mitochondriale Proteine sowie mögliche Bestandteile des retrograden Signalwegs identifiziert. Eine Charakterisierung ausgewählter Proteine erfolgte anhand von Hypoxieversuchen und Expressionsstudien mit entsprechenden T-DNA-Insertionsmutanten.

3.1 Sauerstoffverbrauch und Verhalten von *Arabidopsis thaliana*- Zellkulturen unter Hypoxie

Zur Durchführung von Hypoxieversuchen sowie nachfolgenden Analysen des Transkriptoms und mitochondrialen Proteoms wurde zunächst ein geeignetes Inkubationssystem entwickelt und das Verhalten des Ausgangsmaterials unter hypoxischen Bedingungen charakterisiert.

3.1.1 Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs von *Arabidopsis thaliana*-Zellkulturen

Als Ausgangsmaterial wurden *A. thaliana*-Wildtyp-Zellkulturen der Linie MM1 (Menges und Murray, 2002) verwendet. Diese stellen im Gegensatz zu Pflanzen homogenes Zellmaterial dar und lassen sich schnell in großen Mengen anziehen. Durch eine Kultivierung im Dunkeln lässt sich außerdem die Ausbildung von funktionellen Chloroplasten verhindern. Diese könnten durch die photosynthetische Produktion von Sauerstoff die Ergebnisse der Experimente verfälschen. Alle Versuche wurden zehn Tage nach der letzten Subkultivierung der Zellkulturen durchgeführt. Zur Erzeugung von Hypoxie wurden die Kulturen in einem Anaerobenzelt einer N₂/CO₂-Atmosphäre ausgesetzt.

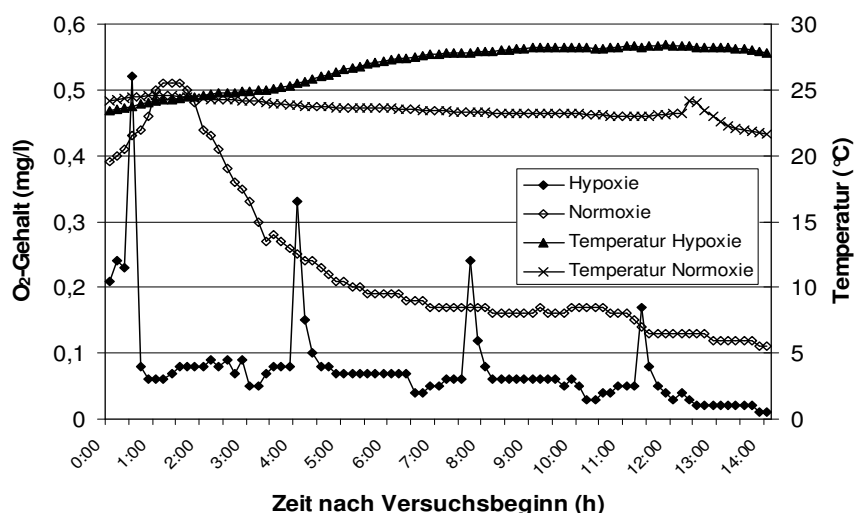


Abbildung 3.1: Exemplarisches Beispiel für den O₂-Verbrauch von *A. thaliana*-Zellkulturen unter Hypoxie.

Als Ausgangsmaterial wurden Zellkulturen zehn Tage nach der letzten Subkultivierung verwendet. Die hypoxische Probe wurde während der Messung einer N₂/CO₂-Atmosphäre ausgesetzt. Die Einzelmessungen erfolgten im Abstand von 10 min.

Durch eine kontinuierliche Messung des Sauerstoffgehalts mit einer O₂-Elektrode wurde der fortschreitende Sauerstoffmangel im Medium überprüft (siehe Abbildung 3.1). Gleichzeitig wurde die Temperatur gemessen, da die Löslichkeit von Gasen in Flüssigkeiten temperaturabhängig ist. In der Kontrolle war eine exakte Bestimmung des Sauerstoffgehalts nicht möglich, da der Sauerstoffsensor für korrekte Messungen eine Mindesteintauchtiefe von 6 cm benötigte. Die Füllhöhe des zur Kultivierung verwendeten Erlenmeyerkolbens betrug dagegen zur ausreichenden Versorgung der Zellen mit Sauerstoff maximal 2 cm. Darüber hinaus war eine Befestigung des Sauerstoffsensors aufgrund der Form des Erlenmeyerkolbens und der Schüttelbewegung des Inkubators nicht möglich. Die in Abbildung 3.1 zu sehenden normoxischen Daten stammen daher aus einer Messreihe, bei der die Füllhöhe der Zellsuspension und die Art der Durchmischung an das Sauerstoffmessgerät angepasst wurde. Die ständige Abnahme des Sauerstoffgehalts im Vergleich zum Anfangswert lässt sich somit durch die höhere Befüllung des Messgefäßes erklären, welche eine schlechtere Verteilung des Sauerstoffs in der Zellsuspension zur Folge hatte. Die Messungen wurden dreimal durchgeführt. Der O₂-Gehalt der hypoxischen Probe nahm von einem Anfangswert von 0,21 mg/l ausgehend ständig ab, bis nach ungefähr 14 Stunden kein Sauerstoff mehr nachweisbar war und somit im Medium anoxische Bedingungen herrschten. Bei allen Messungen traten im Abstand von dreieinhalb bis vier Stunden Ausschläge der Messkurve nach oben auf, deren Spitzen mit der Zeit kleiner wurden. Etwa dreißig bis sechzig Minuten vor jedem Ausschlag wurde ein Abfall des Sauerstoffgehalts um 0,05% beobachtet. Diese Abweichungen waren bei

der Messung des Sauerstoffgehalts normoxischer Zellkulturen nicht zu finden, welcher weit über den korrespondierenden Werten der hypoxischen Zellkulturen lag. Da in dieser Arbeit die Auswirkungen von Hypoxie untersucht sowie eine Schädigung der Zellen durch fortdauernden Sauerstoffmangel vermieden werden sollten, erfolgte die Ernte des Pflanzenmaterials drei Stunden nach Versuchsbeginn bei einem O_2 -Gehalt des Mediums von 0,0225 mg/l.

3.1.2 *Arabidopsis thaliana*-Zellkulturen bilden bei Zugabe von H_2O_2 vermehrt Sauerstoff

Die Ausschläge der Messkurve könnten durch einen stressbedingten Ausstoß von ROS (sog. *Oxidative Bursts*) verursacht worden sein. Die Detektion läßt sich durch die Aktivität des Enzyms Katalase erklären, welches H_2O_2 zu Wasser und Sauerstoff disproportioniert. Eine fluorometrische Analyse des ROS-Ausstoßes war aufgrund des Versuchsaufbaus und der Zusammensetzung des Mediums nicht möglich, da die im Medium enthaltenen Zucker und Spurenelemente aufgrund ihrer Fluoreszenz mit der Messung interferieren. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob das Versetzen der Zellkulturen mit H_2O_2 ebenfalls einen abrupten Anstieg des Sauerstoffgehalts im Medium zur Folge haben würde. Als Kontrolle wurde MSMO-Medium mit H_2O_2 sowie mit H_2O_2 und Katalase versetzt. Nach Zugabe von 500 μ l H_2O_2 stieg die Sauerstoffkonzentration im Zellkulturen enthaltenden Medium von einem Anfangswert von 0,34 mg/l steil an, bis nach sechs Minuten der Spitzenwert von 24,5 mg/l erreicht wurde (siehe Abbildung 3.2).

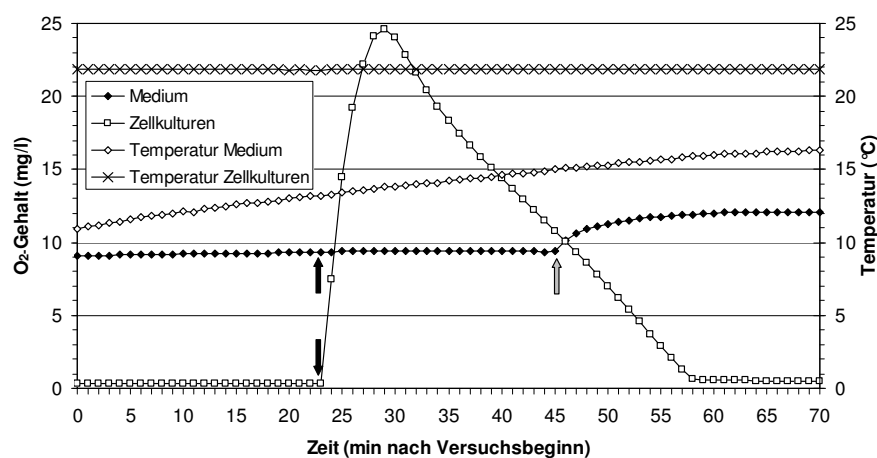


Abbildung 3.2: Exemplarisches Beispiel für die Reaktion von *A. thaliana*-Zellkulturen auf H_2O_2 .

Als Ausgangsmaterial wurden Zellkulturen zehn Tage nach der letzten Subkultivierung sowie MSMO-Medium verwendet. Schwarze Pfeile: Zugabe von 500 μ l H_2O_2 , grauer Pfeil: Zugabe von 500 μ l H_2O_2 und 50 μ l Katalase. Der Versuch fand unter normoxischen Bedingungen statt. Die Einzelmessungen erfolgten im Abstand von 1 min.

Danach fiel die Messkurve innerhalb von etwa 40 Minuten langsam ab, bis der Sauerstoffgehalt 0,45 mg/l betrug. Der Verlauf der Kurve entsprach somit den unter Hypoxie beobachteten Ausschlägen der Messkurve. Auf den O₂-Gehalt von reinem Medium hatte die Zugabe von H₂O₂ keinen Effekt. Erst die Zugabe von 50 µl Katalase führt zu einem Anstieg der Sauerstoffkonzentration von 9 mg/l auf 12 mg/l. Ein darauffolgender Abfall der Messkurve wurde nicht beobachtet.

3.1.3 Hypoxie beeinflusst Morphologie und Verhalten von Mitochondrien

Sauerstoffmangel besitzt möglicherweise einen direkten Einfluss auf die Struktur und Bewegung der Mitochondrien. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden *A. thaliana*-Zellkulturen zehn Tage nach der letzten Subkultivierung für drei und sechs Stunden einer N₂/CO₂-Atmosphäre ausgesetzt. Anschließend erfolgte eine Anfärbung der Mitochondrien mit dem für diese Organellen spezifischen Fluoreszenzfarbstoff MitoTracker® Orange CM-H₂TMRos.

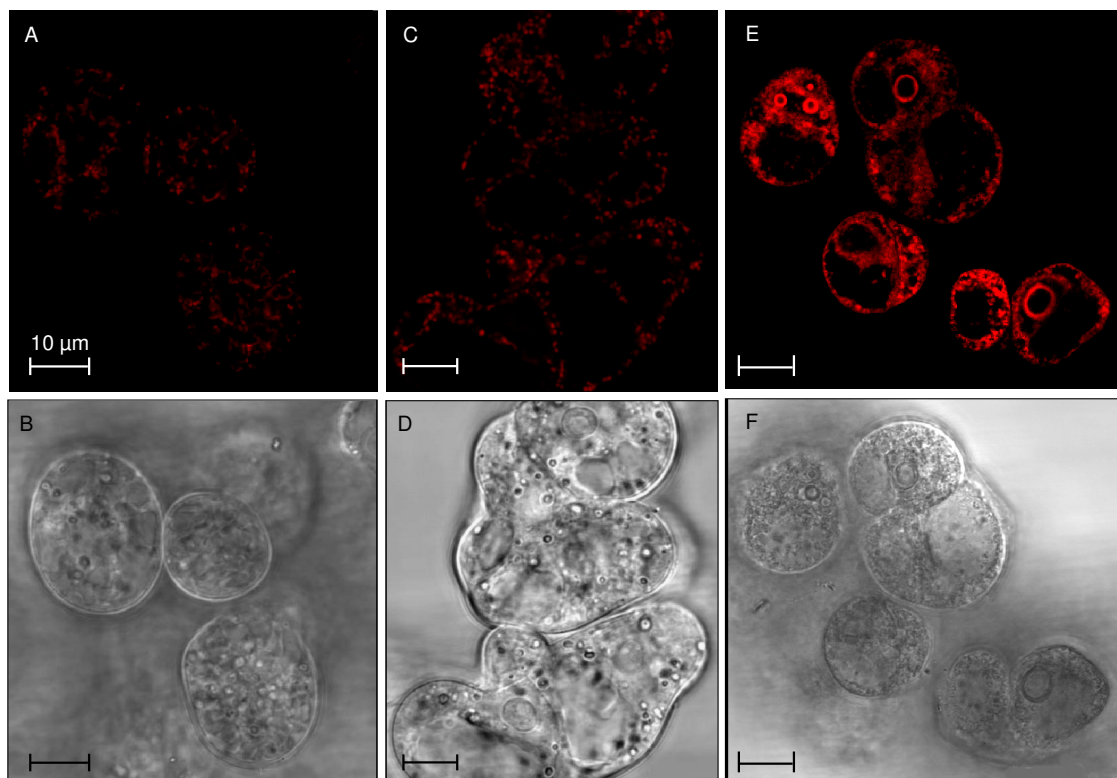


Abbildung 3.3: *A. thaliana*-Mitochondrien bei Normoxie und Hypoxie.

Gezeigt ist jeweils eine Überlagerung von vier am konfokalen Laserscanning-Mikroskop erstellten Einzelaufnahmen. A und B: Normoxische Zellkulturen. C und D: Zellkulturen nach drei Stunden Inkubation unter Hypoxie. E und F: Zellkulturen nach sechs Stunden Inkubation unter Hypoxie. A, C, E: Mit MitoTracker® Orange CM-H₂TMRos angefärbte Mitochondrien. B, D, F korrespondierende Hellfeldaufnahmen. Die Balken entsprechen 10 µm.

Die Verteilung der Fluoreszenz wurde *in vivo* mit einem konfokalen Laserscanningmikroskop bei einer Anregungswellenlänge von 554 nm untersucht. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte bei einer Wellenlänge von 560-610 nm. Bei Normoxie wiesen die Mitochondrien langgezogene, gekrümmte oder hantelförmige Strukturen auf (siehe Abbildung 3.3). Nach dreistündiger Inkubation unter Hypoxie kamen die Mitochondrien dagegen größtenteils vereinzelt vor und zeigten eine eher punktförmige Struktur. Eine verringerte Größe sowie eine verlangsamte Bewegung im Cytoplasma wurden ebenfalls beobachtet. Nach sechs Stunden Inkubation unter hypoxischen Bedingungen kam es zu einer Schwellung der Mitochondrien sowie zur Auflösung ihrer Struktur. Eine verstärkte Aggregation wurde ebenfalls beobachtet.

3.2 Expressionsstudien von hypoxieregulierten nukleären Genen mitochondrial lokalisierter Proteine bei *Arabidopsis thaliana*

Mitochondrien sind aufgrund der nukleären Kodierung ihrer meisten Proteine nicht zu einer direkten Kontrolle der eigenen genetischen Systeme in der Lage. Daher müssen diese Organellen Veränderungen der nukleären Genexpression veranlassen können. Dieser Vorgang wird als retrograde Regulierung bezeichnet (Rhoads und Subbaiah, 2007). Über Bestandteile und Funktion dieses Signalwegs ist erst wenig bekannt. Um die Anpassung pflanzlicher Mitochondrien an hypoxische Bedingungen durch retrograde Regulierung näher zu untersuchen, wurden daher aufgrund von bereits vorhandenen Microarray-Daten durch Sauerstoffmangel in ihrer Expression beeinflusste nukleär kodierte Gene mitochondrial lokalisierter Proteine identifiziert. Basierend auf diesen Ergebnissen sollten anschließend Expressionsanalysen mittels eines GUS-Reportersystems durchgeführt werden. Dies sollte die gewebe- und entwicklungsspezifische Expression dieser Gene bei Hypoxie und Normoxie ermöglichen.

3.2.1 Beeinflussung der Expression durch Hypoxie und weitere abiotische Stressformen

3.2.1.1 Eine Analyse von Microarray-Daten führt zur Identifizierung von 65 hypoxiebeeinflussten nukleären Genen mitochondrialer Proteine

Die Identifizierung von möglicherweise hypoxiebeeinflussten Genen erfolgte auf Grundlage von Microarray-Daten zu Hypoxieexperimenten mit sieben Tage alten *Arabidopsis thaliana*-Keimlingen (Branco-Price et al., 2005; Branco-Price et al., 2008). Diese wurden zwei, neun und zwölf Stunden unter hypoxischen Bedingungen inkubiert. Auf dem für diese Versuche verwendeten Arabidopsis ATH1 Genome Array der Firma Affymetrix befinden sich 360 nukleär kodierte Gene mitochondrial lokalisierter Proteine. Mit Hilfe des Programms *Genevestigator* (<https://www.genevestigator.com/gv/index.jsp>; Zimmermann et al., 2004), wurden anhand dieser Microarray-Daten 65 Gene als hypoxiebeeinflusst identifiziert. Die Grenze wurde für herunterregulierte Gene auf eine log₂-Signalrate von -1 und bei hochregulierten Genen auf eine Log₂-Signalrate von 1 festgelegt. Die Log₂-Signalrate beschreibt eine relative Expressionsänderung. Sie wird bei der Datenanalyse der Microarrays aus dem logarithmierten Quotienten der mit dem spezifischen Hintergrund jedes einzelnen Spots auf dem Chip korrigierten Signale der beiden Farbkanäle berechnet. Eine Übersicht aller 65 Gene mit den zugehörigen Signalraten ist im Anhang dieser Arbeit aufgeführt.

3.2.1.2 Eine Analyse mittels quantitativer Real Time PCR führt zur Identifizierung von sieben hypoxiebeeinflussten nukleären Genen mitochondrialer Proteine

Für genaue Analysen der hypoxiebeeinflussten Transkriptionsraten der unter 3.2.1.1 aufgeführten Gene wurden Untersuchungen mittels quantitativer Real Time PCR durchgeführt. Durch die Verwendung von genspezifischen Oligonukleotiden sowie optimierten Anlagerungstemperaturen und Elongationszeiten lässt sich eine exakte Bestimmung der Genexpression durchführen. Bei der Auswahl geeigneter Gene wurde neben einer starken Beeinflussung der jeweiligen Expressionsraten durch Hypoxie darauf geachtet, sowohl hoch- als auch herunterregulierte Gene in das Experiment mit einzubeziehen. Des Weiteren repräsentieren deren Proteine einen Querschnitt der möglicherweise an der mitochondrialen hypoxischen Stressantwort beteiligten Faktoren. Untersucht wurden die Gene

von drei mitochondrialen Hitzeschockproteinen (ATHSP23.6-mito, ATHSP26.5-mito, ATHSP22-mito) und fünf Transkriptionsterminationsfaktoren (F19K23.4, PDE191, F13G24.100, PTAC15, MDF20.2). Weiterhin wurde die Expressionsraten der für zwei Helikasen kodierenden Gene (PHL, K13H13.20), des Gens einer Ascorbatperoxidase (SAPX), eines Membrankanalproteins (ATOEP16) sowie eines kalziumionenbindenden calmodulinartigen Proteins (CML38) bestimmt. Als Positivkontrollen wurden die Gene der Isoformen AOX1a und AOX1b der Alternativen Oxidase in das Experiment mit aufgenommen. Aufgrund ihrer Induzierung durch zahlreiche Stressformen finden diese beiden Gene häufig als Modelle für durch mitochondriale retrograde Regulierung beeinflusste nukleär kodierte Gene mitochondrial lokalisierter Proteine Verwendung (Ho et al., 2008; Polidoros et al., 2009). Da am Ende von Signaltransduktionskaskaden oftmals Transkriptionsfaktoren die eigentliche Genexpression regulieren, wurde weiterhin das Gen des C2H2-Zinkfinger-Proteins „*Arabidopsis thaliana* Indeterminate (ID)-Domain 14“ (ATIDD14) analysiert. Zur Normalisierung der Ergebnisse und als Negativkontrolle wurden drei interne Haushaltsgene in das Experiment mit aufgenommen. Diese Gene kodieren für das Tonoplast-intrinsische Protein 2 (TIP2), für den Elongationsfaktor 1-alpha (EF1-alpha) und für die Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPB) und werden in ihrer Expression nicht durch Hypoxie beeinflusst. Die als Matrize verwendete Gesamt-RNA stammte aus den unter 3.1.1 beschriebenen Hypoxieversuchen. Nach dreimaliger Durchführung des Experiments konnte die Expression von sieben Genen als eindeutig durch Hypoxie beeinflusst identifiziert werden (siehe Abbildung 3.4).

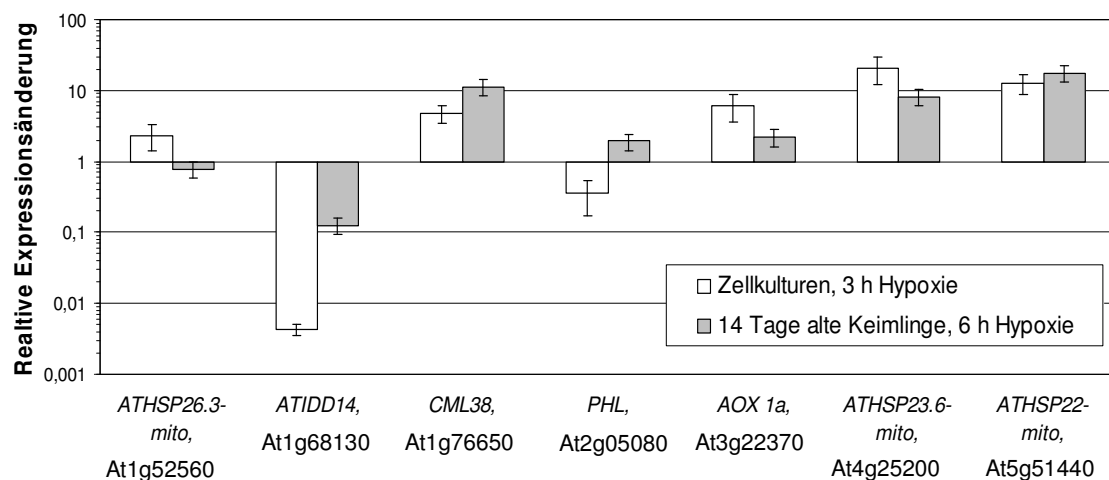


Abbildung 3.4: Mittels quantitativer Real Time PCR bestimmte Expressionsraten hypoxiebeeinflusster Gene.

Zellkulturen wurden zehn Tage nach der letzten Subkultivierung für 3 h einer N_2/CO_2 -Atmosphäre ausgesetzt. 14 Tage alte Keimlinge wurden für 6 h komplett geflutet. Gezeigt ist die logarithmische Darstellung der x-fachen relativen Expression im Vergleich zur normoxischen Kontrolle. Der Kontrollwert beträgt immer 1, bei Werten größer oder kleiner als 1 ist die Expression der entsprechenden Gene herauf- oder herunterreguliert. Die Normalisierung erfolgte mit den Haushaltsgenen *TIP2*, *EF1-alpha* und *GAPB*.

Eine unter Hypoxie verstärkte Expression ($2,341\text{fach} \pm 0,933$) im Vergleich zum normoxischen Kontrollwert zeigte das für *ATHSP26.3-mito* (At1g52560) kodierende Gen. Zusätzlich war die Transkriptrate von *CML38* (At1g76650) bei Sauerstoffmangel erhöht ($4,725\text{fach} \pm 1,303$). *AOX1a* (At3g22370) wies unter diesen Bedingungen ebenfalls eine erhöhte Expression auf ($6,214\text{fach} \pm 2,679$). Auch die für *ATHSP22-mito* (At4g25200) und *ATHSP23.6-mito* (At5g51440) kodierenden Gene zeigten eine erhöhte Transkriptrate ($20,914\text{fach} \pm 8,699$; $12,841\text{fach} \pm 4,040$). In seiner Expression herunterreguliert war das für den Transkriptionsfaktor *ATIDD14* (At1g68130) kodierende Gen ($0,004\text{fach} \pm 0,001$) und das Gen der putativen Helikase *PHL* (At2g05080) ($0,354\text{fach} \pm 0,184$). Mit Ausnahme des für die Helikase kodierenden Gens *PHL* entsprach die Tendenz der Transkripten den Literaturangaben (Branco-Price et al., 2005; Branco-Price et al., 2008). *PHL* ist im Gegensatz zu dem in dieser Arbeit gezeigten Ergebnis in der Literatur als in seiner Expression hochreguliert beschrieben (Branco-Price et al., 2005; Branco-Price et al., 2008).

Um die Beeinflussung der Transkripten durch Dauer und Form der Hypoxie sowie durch das verwendete Ausgangsmaterial zu untersuchen, wurde das Experiment mit aus 14 Tage alten für sechs Stunden im Dunkeln gefluteten Keimlingen isolierter Gesamt-RNA wiederholt. Die Transkripten der Gene *ATIDD14*, *CML38*, *AOX1a*, *ATHSP23.6-mito* und *ATHSP22-mito* zeigten dieselbe Tendenz wie in dem vorherigen Versuch (siehe Abbildung 3.4). *PHL* wurde dagegen bei sechsstündiger Hypoxie verstärkt exprimiert ($1,941\text{fach} \pm 0,506$), während das für *ATHSP26.3-mito* kodierende Gen keine veränderte Transkriptrate im Vergleich zur normoxischen Kontrolle aufwies.

3.2.1.3 *In silico* Expressionsstudien im Bezug auf weitere abiotische Stressformen

Mit Hilfe des Programms *Genevestigator* (Zimmermann et al., 2004) wurden die Expressionsprofile von *ATHSP26.3-mito*, *ATHSP23.6-mito*, *ATHSP22-mito*, *PHL*, *CML38*, *AOX1a* und *ATIDD14* im Bezug auf Kälte-, Hitze-, Salz, Trockenheits-, osmotischen, oxidativen und Verwundungsstress untersucht. So konnten Aussagen darüber getroffen werden, ob die unter 3.2.1.2 beobachteten Reaktionen spezifisch für Hypoxie sind oder eher eine allgemeine Stressantwort darstellen. *ATHSP26.3-mito* und *ATHSP23.6-mito* sind als späte Antwort auf Salzstress, Verwundungsstress, oxidativen und osmotischen Stress sowie Hitzestress heraufreguliert. *ATHSP26.3-mito* wird zusätzlich als frühe Antwort auf Trockenheitsstress verstärkt exprimiert. Eine verminderte Expression war bei *ATHSP26.3-*

mito als frühe Antwort auf Kältestress zu beobachten. *ATHSP23.6-mito* wird bei Kälte im allgemeinen sowie als frühe Antwort auf Salz- und Trockenheitsstress herunterreguliert. Das Gen des Hitzeschockproteins *ATHSP22-mito* weist als frühe Antwort auf Salz- und oxidativen Stress eine verminderte Transkriprate auf. Eine verstärkte Expression tritt bei Hitze sowie als späte Antwort auf Salz- und oxidativen Stress auf. Das Gen des kalziumionenbindenden Proteins CML38 wird bei Kälte, Salz-, Verwundungs-, oxidativem und osmotischem Stress verstärkt exprimiert. Ebenfalls heraufreguliert ist es als frühe Stressantwort bei Trockenheit. Herunterreguliert ist es nur bei Hitzestress. Das für den Transkriptionsfaktor *ATIDD14* kodierende Gen wird als späte Antwort auf osmotischen Stress herunterreguliert, während andere abiotische Stressformen keinen Einfluss auf die Expression besitzen. Eine verminderte Expression zeigte das Gen der putativen Helikase *PHL* bei oxidativem Stress und Salzstress. Eine herunterregulierte Transkriprate tritt ebenfalls als späte Antwort auf osmotischen und Trockenheitsstress auf. Das für die Isoform *AOX 1a* kodierende Gen wird bei Kälte, Salzstress, oxidativem und osmotischem Stress verstärkt exprimiert. Eine Tabelle mit den entsprechenden Expressionsraten ist im Anhang der Arbeit aufgeführt.

3.2.1.4 Test auf mögliche funktionelle Redundanz von *ATHSP26.3-mito*, *ATHSP23.6-mito* und *ATHSP22-mito*

Die mitochondrial lokalisierten kleinen Hitzeschockproteine *ATHSP23.6-mito* und *ATHSP22-mito* sind eng miteinander verwandt. Das dritte mitochondriale kleine Hitzeschockprotein *ATHSP26.3-mito* bildet eine eigene Unterfamilie (Waters et al., 2008). Daher könnten diese drei Proteine unter Umständen vollständig oder partiell redundant sein. Für erste Hinweise auf eine mögliche funktionelle Redundanz wurde mittels quantitativer Real Time PCR eine Beeinflussung der Transkriprate von *ATHSP26.3-mito*, *ATHSP23.6-mito* und *ATHSP22-mito* in homozygoten *knock-out* T-DNA-Insertionsmutanten der Linien *athsp26.3-mito* und *athsp22-mito* untersucht. Die Expression von *ATHSP23.6-mito* war in T-DNA-Insertionsmutanten der Linien *athsp26.3-mito* und *athsp22-mito* gegenüber dem Wildtyp nicht verändert (siehe Abbildung 3.5). Die Linie *athsp26.3-mito* zeigte eine verminderte Expression von *ATHSP22-mito* (0, 0085fach \pm 0, 0002), während die Transkriprate von *ATHSP26.3-mito* in der Linie *athsp22-mito* erhöht war (4, 9585fach \pm 3, 0803).

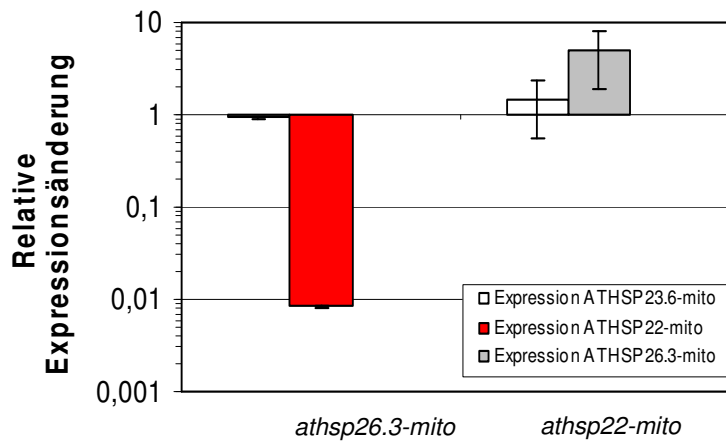


Abbildung 3.5: Expression von *ATHSP23.6-mito*, *ATHSP22-mito* und *ATHSP26.3-mito* in Pflanzen der Linien *athsp26.3-mito* und *athsp22-mito*.

Die verwendete mRNA stammte aus 14 Tage alten unter Langtagbedingungen angezogenen Pflanzen. Gezeigt ist die logarithmische Darstellung der x-fachen relativen Expression im Vergleich zum Wildtyp. Der Wert des Wildtyps beträgt immer 1, bei Werten größer oder kleiner als 1 ist die Expression der entsprechenden Gene herauf- oder herunterreguliert. Die Normalisierung erfolgte mit den Haushaltsgenen *TIP2*, *EF1-alpha* und *GAPB*.

3.2.2 Entwicklungs- und gewebespezifische Expressionsstudien

3.2.2.1 *In silico* Expressionsstudien

Anhand des *Arabidopsis* eFP-Browsers (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>; Winter et al., 2007) lassen sich gewebe- und entwicklungsspezifischen Expressionsmuster mittels cDNA-hybridisierten Genchips der AtGenExpress-Initiative ermitteln (Schmid et al., 2005). Das Gen des kleinen mitochondrialen Hitzeschockproteins *ATHSP26.3-mito* wird demnach in der Blüte, im Pollen, im Embryo und im Samen exprimiert (siehe Tabelle 3.1). *ATIDD14* und *CML38* werden in der gesamten Pflanze exprimiert, wobei *CML38* erhöhte Werte in der Wurzel und in den Kotyledonen aufweist. Das Gen der putativen Helikase *PHL* wird im Apikalmeristem, in den Stamen und Karpellen sowie im Pollen, Embryo und Samen exprimiert. *AOX1a* kommt in der gesamten Pflanze vor. Erhöhte Transkriptraten finden sich in seneszenten Blättern, Hochblättern und in der Blüte. Das Gen des kleinen mitochondrialen Hitzeschockproteins *ATHSP23.6-mito* wird in Wurzel, Stamen, Karpellen sowie im Embryo exprimiert. Die Expression von *ATHSP22-mito* ist auf Wurzel, Blüte, Pollen, Embryo und Samen beschränkt (siehe Anhang Abbildung A5 B,C, D, E, F, G, H).

Tabelle 3.1: Gewebe- und entwicklungsspezifische Expression der unter 3.2.1.2 identifizierten hypoxiebeeinflussten Gene.

Die Expression wurde auf der Basis von Microarray-Daten der AtGenExpress-Initiative mit dem *Arabidopsis* eFP-Browser ermittelt (Schmid et al., 2005; Winter et al., 2007).

Gen	AGI-Nr.	gewebe- und entwicklungsspezifische Expression
<i>ATHSP26.3-mito</i>	At1g52560	Blüte, Pollen, Embryo, Samen
<i>ATIDD14</i>	At1g68130	gesamte Pflanze
<i>CML38</i>	At1g76650	gesamte Pflanze, erhöhte Werte in Kotyledonen, Wurzel
<i>PHL</i>	At2g05080	Embryo, Samen, Pollen, Apikalmeristem, Stamen, Karpelle
<i>AOX1a</i>	At3g22370	gesamte Pflanze, erhöhte Werte in Blüte, Hochblättern, seneszenten Blättern
<i>ATHSP23.6-mito</i>	At4g25200	Stamen, Karpelle, Samen, Wurzel
<i>ATHSP22-mito</i>	At5g51440	Blüte, Pollen, Embryo, Samen, Wurzel

3.2.2.2 Versuche zur Generierung und Charakterisierung von Promotor:GUS-Pflanzen

Zum direkten Nachweis der Regulierung von *ATHSP26.3-mito*, *ATHSP23.6-mito*, *ATHSP22-mito*, *ATIDD14*, *PHL*, *CML38* und *AOX1a* durch Hypoxie bieten sich Analysen der jeweiligen Promotoraktivität mittels Reportergenkonstrukten an. Auf diese Weise lässt sich feststellen, wie stark die entsprechenden Gewebe oder Entwicklungsstadien durch hypoxischen Stress betroffen sind. Als Reportergen wurde das für die β -Glukuronidase aus *Escherichia coli* kodierende Gen *gusA* gewählt. Das Protein spaltet *in vivo* β -Glukuronide, bewirkt aber abhängig vom Substrat unterschiedliche Farbreaktionen. Bei der Spaltung von X-Gluc entsteht ein blauer Farbstoff, durch den sich der Expressionsort des Gens im Gewebe des Zielorganismus bestimmen lässt. Vorteile gegenüber dem Grünen Fluoreszierenden Protein (GFP) und dem Luziferase-Reportergensystem sind das geringe Hintergrundsignal (Jefferson et al, 1987) und die Fixierung des Gewebes vor der sauerstoffabhängigen Nachweisreaktion. Eine Charakterisierung putativer Transformanten erfolgte direkt durch eine Färbung der Blätter. Als Negativ- bzw. Positivkontrolle wurden Blätter von Wildtyp-Pflanzen und von P_{DR5}:GUS-Transformanten in das Experiment mit aufgenommen. Bei DR5 handelt es sich um ein synthetisches auxininduziertes Element, welches wesentlich aktiver ist als die natürlich vorkommenden Promotorbereiche auxininduzierter Gene (Ulmasov et al., 1997).

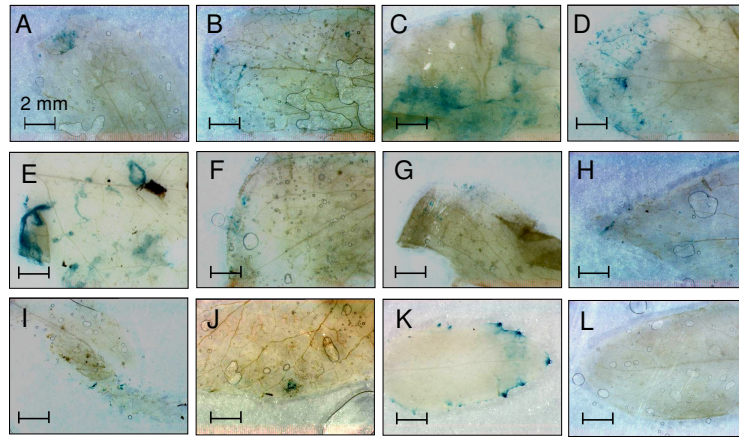


Abbildung 3.6: GUS-Färbung von putativen Transformanten.

Gezeigt sind sechs Linien, die das mit der Promotorregion des Gens *ATIDD14* fusionierte *gusA*-Gen exprimieren könnten sowie vier entsprechende Linien für die Promotorregion des Gens *CML38*. A: *P_{ATIDD14}:GUS-1*; B: *P_{ATIDD14}:GUS-2*; C: *P_{ATIDD14}:GUS-3*; D: *P_{ATIDD14}:GUS-4*; E: *P_{ATIDD14}:GUS-5*; F: *P_{ATIDD14}:GUS-6*; G: *P_{CML38}:GUS-1*; H: *P_{CML38}:GUS-2*; I: *P_{CML38}:GUS-3*; J: *P_{CML38}:GUS-4*; K: *P_{DR5}:GUS*; L: Wildtyp. Die Balken entsprechen 2 mm.

Sechs *P_{ATIDD14}:GUS*-Linien und vier *P_{CML38}:GUS*-Linien zeigten eine Glukuronidaseaktivität. Beim Vergleich der einzelnen Linien fiel eine stark schwankende Intensität der Blaufärbung sowie deren unregelmäßige Verteilung auf (siehe Abbildung 3.6). Das Blatt der Positivkontrolle *P_{DR5}:GUS* zeigte die für diese Linie typische Färbung aktiver Hydathoden (Aloni et al., 2003). Blätter von Wildtyp-Pflanzen zeigten keine Färbung. Aufgrund mangelnder Reproduzierbarkeit erfolgte eine Überprüfung der Transformation durch PCR. Demnach war keine Integration des *gusA*-Gens in das Genom der Pflanzen erfolgt. Es wurde lediglich ein Fragment des Resistenz gegen Kanamycin verleihenden für Neomycinphosphotransferase II kodierenden Gens *NPTII* nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Dieses Gen befindet sich in der Transfer (T)-DNA-Region der verwendeten Vektoren (Koncz und Schell, 1986). Es stammt aus dem in *E. coli* vorkommenden Transposon Tn5 und kommt nicht auf natürliche Weise in Pflanzen vor (Beck et al., 1982; Reiss et al., 1984; Simoens et al., 1986; Yenowski et al., 1990). Die erfolgreiche Selektion der oben aufgeführten Linien auf kanamycinhaltigem Medium ist somit auf eine unvollständige Übertragung der T-DNA-Region zurückzuführen. Somit wurden keine Promotor:GUS-Pflanzen für die Gene *ATHSP26.3-mito*, *ATIDD14*, *CML38*, *pHL*, *AOX1a*, *ATHSP23.6-mito* und *ATHSP22-mito* erstellt.

3.3 Untersuchung einer möglichen Beteiligung von kalziumabhängigen Proteinkinasen an der mitochondrialen retrograden Signaltransduktion bei Hypoxie

Mit hoher Wahrscheinlichkeit spielen Ca^{2+} -Ionen eine Rolle in der mitochondrialen retrograden Signaltransduktion (Rhoads und Subbaiah, 2007). Die Art der Weiterleitung des Ca^{2+} -Signals zum Nukleus ist bislang unklar. Neben einer direkten Funktion von Kalzium in der Initiierung der Transkription (Pusl et al., 2002) wird eine Involvierung von kalziumbindenden Proteinen (Sanders et al., 2002; Tuteja und Mahajan, 2007) sowie von verschiedenen an biotischen und abiotischen Stressantworten beteiligten Transkriptionsfaktoren diskutiert (Chen et al., 2002). Kalziumabhängige Proteinkinasen (CDPKs) sind aufgrund ihrer wichtigen Funktion in der pflanzlichen Stressantwort möglicherweise ebenfalls daran beteiligt (Cheng et al., 2002; Romeis et al., 2001). Aus diesem Grund könnten diese Proteine eine wichtige Funktion in der Übertragung des Hypoxiesignals an den Nukleus besitzen. In dieser Studie sollten daher hypoxiebeeinflusste kalziumabhängige Proteinkinasen identifiziert und charakterisiert werden.

3.3.1 Identifizierung von hypoxieregulierten kalziumabhängigen Proteinkinasen mittels bioinformatischer Methoden

Bei hypoxischem Stress werden vermehrt mitochondriale Ca^{2+} -Ionen ins Cytosol ausgeschüttet (Subbaiah et al., 1994; Subbaiah et al., 1998). Daher wäre unter Umständen mit einer verstärkten Expression der Gene von an der Weiterleitung des Ca^{2+} -Signals beteiligten CDPKs zu rechnen. Mit Hilfe des Programms *Genevestigator* (Zimmermann et al., 2004) wurden basierend auf bereits vorhandenen Daten (Branco-Price et al., 2005; Branco-Price et al., 2008) fünf in ihrer Genexpression durch Hypoxie beeinflusste kalziumabhängige Proteinkinasen identifiziert. Von diesen wurden die Proteine CPK22 (At4g04710), CPK23 (At4g04740) und CPK25 (At2g35890) für weitere Versuche ausgewählt (siehe Tabelle 3.2). CPK23 ist in der Plasmamembran lokalisiert (Geiger et. al., 2010), während CPK22 cytoplasmatisch lokalisiert ist (siehe 3.4).

Tabelle 3.2: Expression von *CPK22*, *CPK23* und *CPK25* bei hypoxischem Stress und subzelluläre Lokalisation der entsprechenden Proteine.

Gezeigt sind die Log2-Signalraten bei zwei-, neun- und zwölfstündiger Inkubation unter Hypoxie sowie die subzelluläre Lokalisation. Die Analyse der Daten wurde mit dem Programm *Genevestigator* (Zimmermann et al., 2004) durchgeführt. Die Expression wurde bei einer Log2-Rate kleiner als -1 und größer als 1 im Vergleich zur normoxischen Kontrolle als hypoxiebeeinflusst definiert. Erhöhte Werte sind rot und verminderte Werte schwarz hinterlegt. Die subzelluläre Lokalisation von CPK25 wurde mit dem Programm *SubLoc* (Hua und Sun, 2001) bestimmt. Die Wahrscheinlichkeit ist in Klammern angegeben

Protein	AGI-Nr.	Log2 Signalrate (2 h Hypoxie)	Log2 Signalrate (9 h Hypoxie)	Log2 Signalrate (12 h Hypoxie)	Lokalisation
CPK22	At4g04710	0,66	1,15	1,13	Cytosol ¹ (GFP; siehe 3.4)
CPK23	At4g04740	1,05	1,47	0,33	Plasmamembran (YFP; Geiger et al., 2010)
CPK25	At2g35890	-2,74	1,39	-1	Nukleus (0,84; <i>SubLoc</i>)

Mitochondrien kommen sowohl frei beweglich im Cytoplasma als auch über Mikrotubuli in der Plasmamembran verankert vor (Logan und Leaver, 2000; Mao et al., 2005). Daher könnten CPK22 und CPK23 aufgrund ihrer subzellulären Lokalisation mitochondriale Ca^{2+} -Signale weiterleiten. CPK25 ist nach Vorhersagen des Programms *SubLoc* (Hua und Sun, 2001) nukleär lokalisiert. Ein durch Anoxie hervorgerufener Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration wird von einer erhöhten Ca^{2+} -Konzentration im Nukleus begleitet (Subbaiah et al., 1998). Daher könnte CPK25 ebenfalls an der Transduktion mitochondrialer Ca^{2+} -Signale beteiligt sein. Eine entsprechende Übersicht aller kalziumabhängigen Proteinkinasen ist im Anhang der Arbeit aufgeführt (siehe Tabelle A3).

3.3.2 Analyse der Expression von *CPK22*, *CPK23* und *CPK25* unter hypoxischem Stress mittels quantitativer Real Time PCR

Für genaue Analysen der Transkriptionen von *CPK22*, *CPK23* und *CPK25* wurden Untersuchungen mittels quantitativer Real Time PCR durchgeführt. Die für dieses Experiment verwendete Gesamt-RNA stammte aus den unter 3.2.1.2 beschriebenen Hypoxieversuchen. Die Expression der Gene *CPK22* und *CPK23* war bei Sauerstoffmangel erhöht (6, 418fach \pm 0, 463; 1, 816fach \pm 0, 238) (siehe Abbildung 3.12). Das Ergebnis wurde in zwei weiteren Experimenten bestätigt. Die Expression des Gens *CPK25* war bei zwei Experimenten vermindert (0, 515fach \pm 0, 021; 0, 214fach \pm 0, 146), während sie im dritten Experiment erhöht war (1, 733fach \pm 0, 441). Da die Werte aller drei Experimente gemittelt wurden, weist die Transkription von *CPK25* keinen Unterschied zum normoxischen Kontrollversuch auf.

¹ Eigene Daten

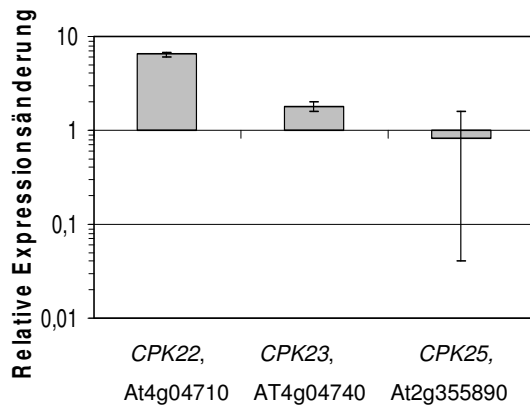


Abbildung 3.7: Expression von CPK22, CPK23 und CPK25 nach dreistündiger Inkubation unter Hypoxie.

Zellkulturen wurden zehn Tage nach der letzten Subkultivierung einer N_2/CO_2 -Atmosphäre ausgesetzt. Gezeigt ist die logarithmische Darstellung der x-fachen relativen Expression im Vergleich zur normoxischen Kontrolle. Der Kontrollwert beträgt immer 1, bei Werten größer oder kleiner als 1 ist die Expression Gene herauf- oder herunterreguliert. Die Normalisierung erfolgte mit den Haushaltsgenen *TIP2*, *EF1-alpha* und *GAPB*.

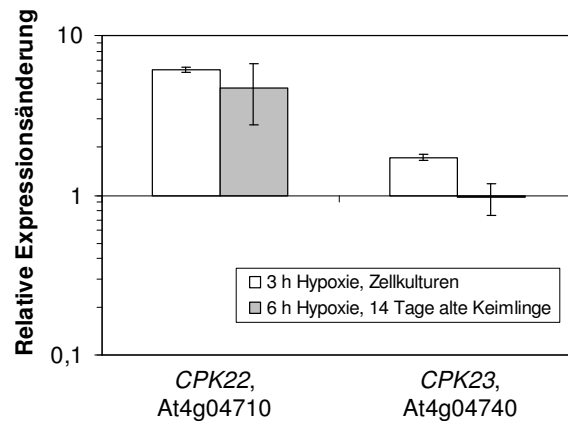


Abbildung 3.8: Expressionsraten von CPK22 und CPK23 nach drei- und sechsstündiger Inkubation unter Hypoxie.

Zellkulturen wurden zehn Tage nach der letzten Subkultivierung einer N_2/CO_2 -Atmosphäre ausgesetzt. 14 Tage alte Keimlinge wurden komplett geflutet. Gezeigt ist die logarithmische Darstellung der x-fachen relativen Expression im Vergleich zur normoxischen Kontrolle. Der Kontrollwert beträgt 1, bei Werten größer oder kleiner als 1 ist die Expression herauf- oder herunterreguliert. Die Normalisierung erfolgte mit den Haushaltsgenen *TIP2*, *EF1-alpha* und *GAPB*.

Die Expression von *CPK22* und *CPK23* ist möglicherweise neben der Dauer und Art des Sauerstoffmangels auch vom untersuchten Ausgangsmaterial abhängig. Daher wurden 14 Tage alte *A. thaliana*-Wildtyp-Pflanzen für sechs Stunden im Dunkeln komplett geflutet. Nach Isolierung der Gesamt-RNA wurden mittels quantitativer Real Time PCR die Expressionsraten von *CPK22* und *CPK23* bestimmt. *CPK22* ist unter diesen Bedingungen hochreguliert (4, 71fach \pm 1, 943) und zeigt keinen Unterschied zur Expression in Zellkulturen nach dreistündiger Hypoxie (siehe Abbildung 3.13). Die Expression von *CPK23* wies nach sechsstündiger Hypoxie in 14 Tage alten Pflanzen keinen Unterschied zur normoxischen Kontrolle auf, während dieses Gen bei dreistündigem Sauerstoffmangel in Zellkulturen hochreguliert ist.

3.3.3 *In silico* Expressionsstudien von *CPK22* und *CPK23* im Bezug auf weitere abiotische Stressformen sowie Entwicklungs- und Gewebespezifität

Kalziumabhängige Proteinkinasen sind an der Weiterleitung zahlreicher biotischer und abiotischer Stresssignale beteiligt (Cheng et al., 2002; Ma und Wu, 2007). Um Aussagen darüber treffen zu können, ob die unter 3.5.2 beobachteten Reaktionen spezifisch für Hypoxie

sind oder eher eine allgemeine Stressantwort darstellen, wurden mit Hilfe des Programms *Genevestigator* (Zimmermann et al., 2004) die Expressionsprofile der für CPK22 und CPK23 kodierenden Gene im Bezug auf weitere abiotische Stressformen untersucht. Die Expression von *CPK23* lediglich bei Kältestress herabreguliert, während die Transkriptionsrate von *CPK22* durch abiotischen Stress nicht beeinflusst wird. Eine genaue Übersicht des Einflusses der verschiedenen Stressformen auf die Expression von CPK22 und CPK23 ist im Anhang der Arbeit zu finden (siehe Tabelle A4).

Die gewebe- und entwicklungsspezifische Expression von *CPK22* und *CPK23* wurde basierend auf Microarray-Daten der AtGenExpress-Initiative mithilfe des *Arabidopsis eFP-Browsers* ermittelt (Winter et al., 2007; Schmid et al., 2005). Sowohl *CPK22* als auch *CPK23* werden in der gesamten Pflanze exprimiert. Erhöhte Werte treten in seneszenten Blättern auf. *CPK22* wird zusätzlich vermehrt im Apikalmeristem exprimiert, während *CPK23* in den Hochblättern erhöhte Transkriptionen aufweist. Die Expressionsraten sind im Anhang aufgeführt (siehe Abbildung A5 I und J).

3.3.4 Untersuchung der Expression von nukleär kodierten Genen mitochondrial lokalisierter Proteine bei T-DNA-Insertionsmutanten

Im Fall einer Beteiligung von CPK22 und CPK23 an der durch Sauerstoffmangel ausgelösten mitochondrialen retrograden Signaltransduktion könnte eine Fehlfunktion dieser Proteine zu einer fehlerhaften Weiterleitung von hypoxieinduzierten Signalen an den Nukleus führen. Dies hätte eventuell Veränderungen der Expressionsraten von nukleär kodierten Genen mitochondrial lokalisierter Proteine zur Folge. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden 14 Tage alte *A. thaliana*-Wildtyp-Pflanzen sowie gleichaltrige homozygote *knock-down* T-DNA-Insertionsmutanten der Linie *cpk22* und homozygote *knock-out* T-DNA-Insertionsmutanten der Linie *cpk23* für sechs Stunden komplett geflutet oder als Kontrolle unter normoxischen Bedingungen kultiviert. Zur Unterbindung der Sauerstoffproduktion durch Photosynthese erfolgte in dieser Zeit eine Verdunklung der Pflanzen. Nach Isolierung der Gesamt-RNA wurden mittels quantitativer Real Time PCR die Expressionsraten der unter 3.2.1.3 beschriebenen sieben hypoxieregulierten nukleär kodierten Gene mitochondrial lokalisierter Proteine untersucht. Als Kontrolle wurde das für die Untereinheit II der Cytochrom-c-Oxidase (COXII) kodierende Gen (AtMg00160) mit in das Experiment aufgenommen.

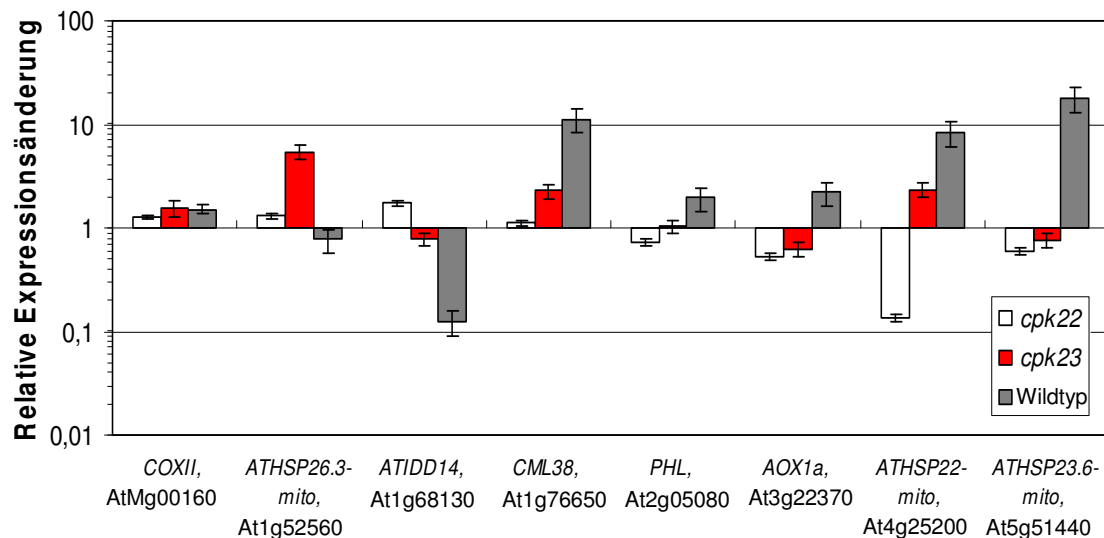


Abbildung 3.9: Expressionsraten nukleär und mitochondrial kodierter Gene mitochondrial lokalisierter Proteine bei 14 Tage alten Pflanzen der Linien *cpk22* und *cpk23* nach sechsständiger Flutung.

Gezeigt ist die logarithmische Darstellung der x-fachen relativen Expression im Vergleich zur normoxischen Kontrolle. Der Kontrollwert beträgt 1, bei Werten größer oder kleiner als 1 ist die Expression herauf- oder herunterreguliert. Die Normalisierung erfolgte mit den Haushaltsgenen *TIP2*, *EF1-alpha* und *GAPB*.

Dieses befindet sich im mitochondrialen Genom (Unseld et al., 1997). Seine Expression sollte abgesehen von möglichen Rückkopplungseffekten von einer Störung der mitochondrialen retrograden Signaltransduktion nicht betroffen sein. Die Expression der nukleär kodierten Gene war unter hypoxischen Bedingungen im Wildtyp stärker betroffen als in den Mutanten (siehe Abbildung 3.9). Der Effekt war mit Ausnahme des Gens *ATHSP26.3-mito* bei Pflanzen der Linie *cpk22* ausgeprägter als bei der Linie *cpk23*. Für die Expression des Gens der mitochondrial kodierten COXII wurde kein Unterschied zwischen den einzelnen Linien beobachtet.

3.3.5 Test auf mögliche funktionelle Redundanz von CPK22 und CPK23

Die kalziumabhängigen Proteinkinasen CPK22 und CPK23 sind eng miteinander verwandt. Ihre Gene befinden sich hintereinander in einem Abstand von 3725 bp auf dem vierten Chromosom von *A. thaliana* und werden in dieselbe Richtung transkribiert (Hrabak et al., 2003). Sollte eines der beiden Proteine nicht mehr funktionsfähig sein, könnte möglicherweise eine funktionelle Redundanz auftreten. Daher wurde mittels quantitativer Real Time PCR eine eventuelle Beeinflussung der Transkriptraten in homozygoten *knock-down* bzw. *knock-out* Mutanten der Linien *cpk22* und *cpk23* untersucht. Als Kontrolle wurden die Transkriptraten der beiden Gene im Wildtyp untersucht.

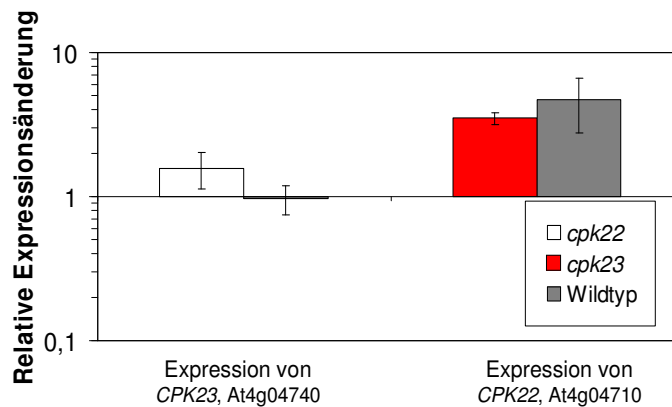


Abbildung 3.10: Expression von CPK22 und CPK23 in 14 Tage alten Wildtyp-Pflanzen sowie in gleichaltrigen Pflanzen der Linien *cpk22* und *cpk23* nach sechsständiger Flutung.

Gezeigt ist die logarithmische Darstellung der x-fachen relativen Expression im Vergleich zur normoxischen Kontrolle. Der Kontrollwert beträgt 1, bei Werten größer oder kleiner als 1 ist die Expression herauf- oder herunterreguliert. Die Normalisierung erfolgte mit den Haushaltsgenen *TIP2*, *EF1-alpha* und *GAPB*.

Als Ausgangsmaterial wurde Gesamt-RNA aus 14 Tage alten für sechs Stunden im Dunkeln gefluteten Pflanzen verwendet. Die Expression von *CPK23* in Pflanzen der Linie *cpk22* zeigte keinen Unterschied im Vergleich zum Wildtyp (siehe Abbildung 3.10). Gleiches wurde für die Expression von *CPK22* in Pflanzen der Linie *cpk23* gezeigt. Dieses Ergebnis wurde in zwei weiteren Wiederholungen des Experiments bestätigt.

Somit führte diese Studie zur Identifizierung der beiden unter Hypoxie verstärkt exprimierten kalziumabhängigen Proteinkinasen CPK22 und CPK23. Ihre Transkriptraten sind bei anderen abiotischen Stressformen nicht erhöht. Ein *knock-down* bzw. *knock-out* von *CPK22* und *CPK23* verändert die Transkriptraten nukleär kodierter Gene mitochondrial lokalisierter Proteine im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen. Das mitochondrial kodierte *COXII*-Gen wird in seiner Expression nicht beeinflusst. Ein Hinweis auf eine mögliche funktionelle Redundanz von CPK22 und CPK23 wurde nicht erbracht.

3.4 Die Proteine ATHSP26.3-mito, ATIDD14, CML38, PHL, ATHSP23.6-mito und ATHSP22-mito sind mitochondrial lokalisiert, während CPK22 cytoplasmatisch lokalisiert ist

Durch die Bestimmung der subzellulären Lokalisation eines Proteins lassen sich Hinweise auf dessen mögliche Funktion auf Organellebene erbringen. Für eine exakte Charakterisierung sind solche Untersuchungen daher unerlässlich. Für die Proteine der in 3.2 und 3.3 beschriebenen hypoxiebeeinflussten Gene wurde eine Bestimmung der subzellulären Lokalisation *in vivo* bisher nur für die Isoform 1a der Alternativen Oxidase AOX1a (At3g22370), die kalziumabhängige Proteinkinase CPK23 (At4g04740) und den Transkriptionsfaktor ATIDD14 (At1g68130) durchgeführt. AOX1a ist demnach mitochondrial lokalisiert (Carrie et al., 2009), während CPK23 ein Protein der Plasmamembran darstellt (Geiger et al., 2010). Bei ATIDD14 handelt es sich um ein nukleär lokalisiertes Protein (Lee et al., 2005). Die Verteilung der GFP-Fluoreszenz bei Lee et al. könnte zusätzlich auf eine mögliche mitochondriale Lokalisation hinweisen. ATIDD14 verfügt über zwei unterschiedliche Spleißvarianten, die sich in ihrer Länge um 86 Aminosäuren unterscheiden (Annotationen der Datenbank TAIR, <http://www.arabidopsis.org/>). Bioinformatische Vorhersagen wiesen auf eine mögliche nukleäre Lokalisation der längeren Variante hin, während die kürzere Version im Nukleus sowie in den Mitochondrien lokalisiert sein könnte (siehe Tabelle 3.2). Da in dieser Arbeit eine mögliche mitochondriale Lokalisation von ATIDD14 untersucht werden sollte, beziehen sich die folgenden Versuche auf die kürzere Spleißvariante dieses Proteins. Die drei kleinen mitochondrialen Hitzeschockproteine ATHSP26.3-mito (At1g52560), ATHSP22-mito (At5g51440) und ATHSP23.6-mito (At4g25200) sind laut bioinformatischer Vorhersagen der Programme *Predotar* (<http://urgi.versailles.inra.fr/predotar/predotar.html>; Small et al., 2004), *MitoprotII* (<http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>; Claros und Vincens, 1996) und *SubLoc* (<http://www.bioinfo.tsinghua.edu.cn/SubLoc/>; Hua und Sun, 2001) sowohl nukleär als auch mitochondrial lokalisiert. Das calmodulinartige Protein CML38 (At1g76650) befindet sich laut massenspektrometrischer Analysen in der Plasmamembran (Benschop et al., 2007). In den Annotationen der Firma Affymetrix bezüglich der *A. thaliana*-Microarrays ATH1 wird CML38 als plastidär lokalisiert aufgeführt. Bioinformatische Vorhersagen der Programme *MitoprotII* und *SubLoc* weisen auf eine mitochondriale bzw. nukleäre Lokalisation hin.

Tabelle 3.3: Vorhersagen der subzellulären Lokalisation der hypoxieregulierten Proteine ATIDD14, CPK23, AOX1a, ATHSP26.3-mito, CML38, PHL, ATHSP23.6-mito, ATHSP22-mito und CPK22.

Die bioinformatischen Vorhersagen erfolgten mit den Programmen *Predotar* (Small et al., 2004), *MitoprotII* (Claros und Vincens, 1996) und *SubLoc* (Hua und Sun, 2001). Die jeweiligen Wahrscheinlichkeiten sind in Klammern angegeben.

Protein	Subzelluläre Lokalisation	Quelle	Angewendete Methode
ATHSP26.3-mito	Mitochondrien (0,97) Mitochondrien (0,79) Nukleus (0,91)	<i>MitoprotII</i> <i>Predotar</i> <i>SubLoc</i>	Bioinformatische Vorhersage Bioinformatische Vorhersage Bioinformatische Vorhersage
ATIDD14	Nukleus Mitochondrien (0,27; kurze Spleißvariante), nicht bestimmbar (lange Spleißvariante) Mitochondrien (0,2; kurze Spleißvariante) nicht bestimmbar (lange Spleißvariante) Nukleus (0,94)	Lee et al., 2005 <i>MitoprotII</i> <i>Predotar</i> <i>SubLoc</i>	GFP-Fusionskonstrukte Bioinformatische Vorhersage Bioinformatische Vorhersage Bioinformatische Vorhersage
CML38	Plasmamembran Plastiden Nicht bestimmbar Mitochondrien (0,92) Nukleus (0,97)	Benschop et al., 2007 ATH1, Affymetrix <i>Predotar</i> <i>MitoprotII</i> <i>SubLoc</i>	Massenspektrometrie Microarray-Annotationen Bioinformatische Vorhersage Bioinformatische Vorhersage Bioinformatische Vorhersage
PHL	Nukleus und Mitochondrien Nicht bestimmbar Mitochondrien (0,55) Cytoplasma (0,56)	ATH1, Affymetrix <i>Predotar</i> <i>MitoprotII</i> <i>SubLoc</i>	Microarray-Annotationen Bioinformatische Vorhersage Bioinformatische Vorhersage Bioinformatische Vorhersage
AOX 1a	Mitochondrien Mitochondrien Mitochondrien (0,58) Mitochondrien (0,88) Mitochondrien (0,74)	Carrie et al., 2005 Heazlewood et al., 2004 <i>Predotar</i> <i>MitoprotII</i> <i>SubLoc</i>	RFP-Fusionskonstrukte Massenspektrometrie Bioinformatische Vorhersage Bioinformatische Vorhersage Bioinformatische Vorhersage
ATHSP23.6-mito	Mitochondrien (0,9) Mitochondrien (1) Nukleus (0,94)	<i>Predotar</i> <i>MitoprotII</i> <i>SubLoc</i>	Bioinformatische Vorhersage Bioinformatische Vorhersage Bioinformatische Vorhersage
ATHSP22-mito	Mitochondrien (0,67) Mitochondrien (1) Nukleus (0,74)	<i>Predotar</i> <i>MitoprotII</i> <i>SubLoc</i>	Bioinformatische Vorhersage Bioinformatische Vorhersage Bioinformatische Vorhersage
CPK22	Nicht bestimmbar Nicht bestimmbar Nukleus (0,56)	<i>Predotar</i> <i>MitoprotII</i> <i>SubLoc</i>	Bioinformatische Vorhersage Bioinformatische Vorhersage Bioinformatische Vorhersage
CPK23	Plasmamembran Nicht bestimmbar Nicht bestimmbar Cytoplasma (0,74)	Geiger et al., 2010 <i>Predotar</i> <i>MitoprotII</i> <i>SubLoc</i>	YFP-Fusionskonstrukte Bioinformatische Vorhersage Bioinformatische Vorhersage Bioinformatische Vorhersage

Die putative Helikase PHL (At2g05080) ist laut den Annotationen des Microarrays ATH1 nukleär und mitochondrial lokalisiert. Laut *MitoprotII* und *SubLoc* befindet sich die subzelluläre Lokalisation dieses Proteins in den Mitochondrien und im Cytoplasma. Die kalziumabhängige Proteinkinase CPK22 (At4g04710) ist nach der Vorhersage des Programms *SubLoc* nukleär lokalisiert. Allerdings wurde diese Annahme durch kein weiteres Programm bestätigt. Durch die Programme *Predotar*, *MitoprotII*, *TargetP* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>; Emanuelsson, 2000) und *WolfPsort* (<http://wolfsort.org/>; Horton et al., 2006) wurde lediglich eine plastidäre, mitochondriale oder extrazelluläre Lokalisation ausgeschlossen.

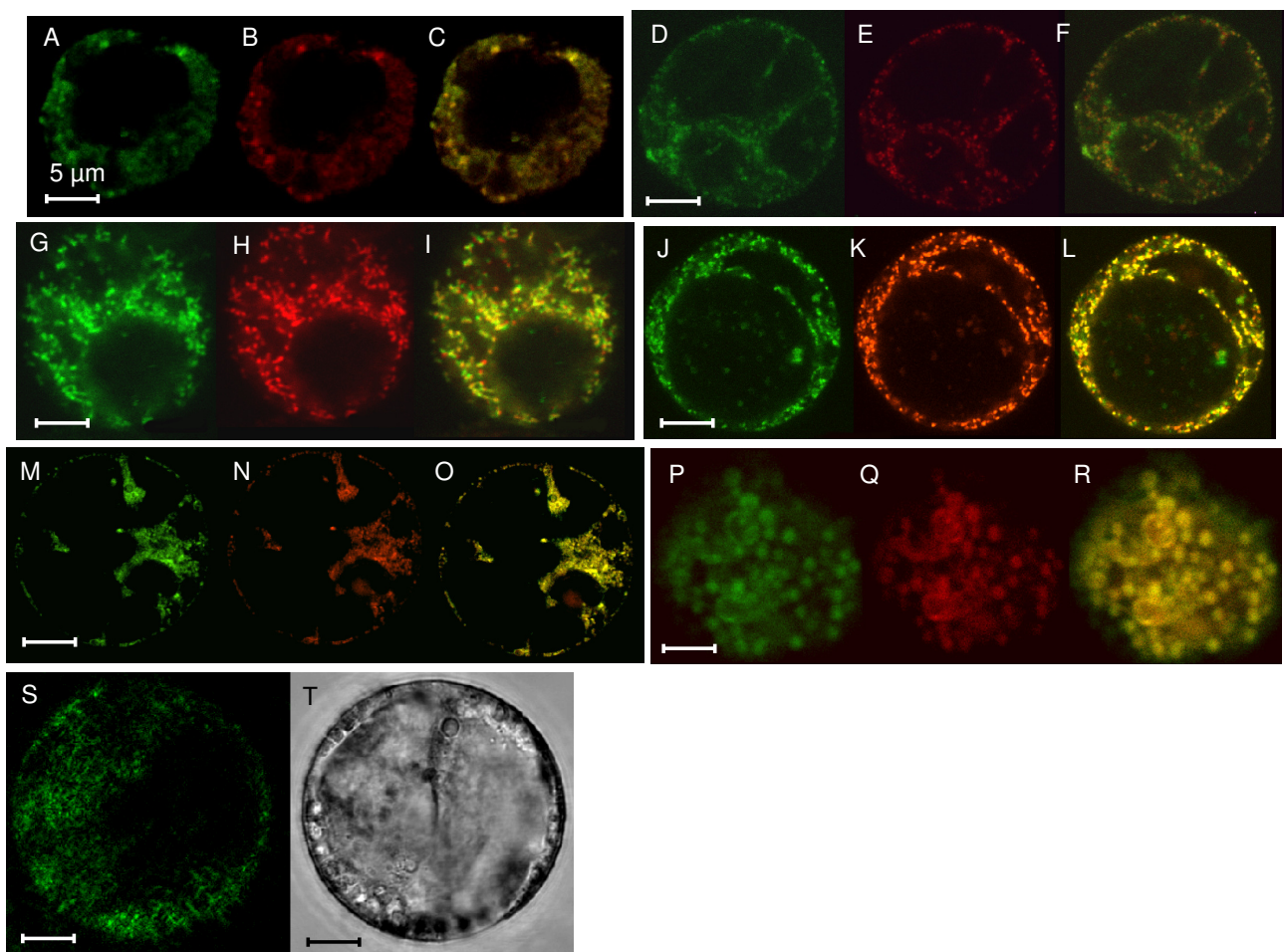


Abbildung 3.11: Lokalisation der GFP-Fusionsproteine in *A. thaliana*-Protoplasten.

Gezeigt ist jeweils eine Überlagerung von vier am konfokalen Laserscanning-Mikroskop erstellten Einzelaufnahmen. A-C: ATHSP26.3-mito; D-F: CML38; G-I: PHL; J bis L: ATHSP23.6-mito; M-O: ATHSP22-mito; P-R: ATIDD14; S und T: CPK22. A, D, G, J, M, P, S: GFP; B, E, H, K, N, Q: MitoTracker® Orange CM-H2TMRos; C, F, I, L, O, R: Überlagerung; T: Hellfeldaufnahme. Die Balken entsprechen 5 µm.

Zur eindeutigen Bestimmung der subzelluläre Lokalisation von ATHSP26.3-mito, ATHSP23.6-mito, ATHSP22-mito, PHL, ATIDD14, CML38 und CPK22 wurden für die entsprechenden Gene Fusionskonstrukte erstellt. Diese sollten einen Nachweis der Lokalisation *in vivo* durch konfokale Laserscanning-Mikroskopie ermöglichen. Als Reportergen wurde das Grün Fluoreszierende Protein (GFP) gewählt, ein stark fluoreszierendes Protein aus dem marinen zum Stamm der *Cnidaria* gehörenden Tier *Aequorea victoria*. GFP ist für den Zielorganismus nicht toxisch, benötigt für die Fluoreszenz weder Substrate noch Kofaktoren und lässt sich im auch in der lebenden Zelle nachweisen. Als Expressionssystem für die GFP-Fusionskonstrukte wurden aus *A. thaliana*-Zellkulturen der Linie MM1 isolierte Protoplasten verwendet. Diese wurden mit dem entsprechenden Konstrukt transient transformiert. Nach Ablauf der maximal achtstündigen Inkubation erfolgte eine Gegenfärbung der Mitochondrien mit dem für diese Organellen spezifischen Fluoreszenzfarbstoff MitoTracker® Orange CM-H₂TMRos. Die Anfärbung der Mitochondrien sowie die transiente Expression der Fusionskonstrukte und subzelluläre Verteilung der Fluoreszenz wurden anschließend *in vivo* mit einem konfokalen Laserscanningmikroskop bei Anregungswellenlängen von 488 nm und 554 nm untersucht. Die Detektion der Fluoreszenz von GFP erfolgte bei einer Wellenlänge von 500-540 nm, wogegen die Emission des Farbstoffs MitoTracker® Orange CM-H₂TMRos bei einer Wellenlänge von 560-610 nm zu beobachten war. Alle putativ mitochondrial lokalisierten Fusionsproteine bewirkten eine deutlich erkennbare GFP-Fluoreszenz in Strukturen mit punkt- oder stäbchenförmiger Morphologie (siehe Abbildung 3.11). Durch den Wechsel der Fluoreszenz von grün (GFP) oder rot (Mitotracker) zu orangegelb in der Überlagerungsansicht wurde die Koloalisation der Proteine und des Farbstoffs MitoTracker® Orange CM-H₂TMRos visualisiert. Somit wurde der Hinweis auf eine mitochondriale Lokalisation von ATHSP26.3-mito, ATIDD14, CML38, PHL, ATHSP23.6-mito und ATHSP22-mito erbracht. CML38 könnte außerdem zusätzlich im Cytosol lokalisiert sein, da das entsprechende GFP-Signal auch außerhalb der durch den Farbstoff MitoTracker® Orange CM-H₂TMRos markierten mitochondrialen Strukturen zu sehen ist (siehe Abbildung 3.11, D-F). Eine mögliche plastidäre Koloalisation wurde nicht untersucht, da die Protoplasten aufgrund der Anzucht im Dunkeln keine funktionellen Chloroplasten besaßen. Die kalziumabhängige Proteinkinase CPK22 ist cytoplasmatisch lokalisiert (siehe Abbildung 3.11, S und T). Für den Transkriptionsfaktor ATIDD14 konnte im Gegensatz zu den von Lee et al. durchgeführten Versuchen lediglich eine mitochondriale Lokalisation nachgewiesen werden.

```

ATIDD14_333_AA -----
ATIDD14_419_AA MIDYERSNTTKNINTHHNPPSSSSSLLPDGNGTAVTQKKRRRPAGTPDPEAEVVSLS

ATIDD14_333_AA -----MHRRRHKVPWKLLKRETNEEVKRKVYVCPEPTCL
ATIDD14_419_AA PRTLLESDRYVCEICNQGFQRDQNLQMHRRRHKVPWKLLKRETNEEVKRKVYVCPEPTCL
*****

ATIDD14_333_AA HHNPCHALGDLVGIKKHFRKHSNHHKQWICERCSKGYAVQSDYKAHLKTCGTRGHSCDCG
ATIDD14_419_AA HHNPCHALGDLVGIKKHFRKHSNHHKQWICERCSKGYAVQSDYKAHLKTCGTRGHSCDCG
*****

ATIDD14_333_AA RVFSRVESFIEHQDTCTVRRSQPSNHLRHEQQQHTTNATQTASTAENNENGDSLIGPILP
ATIDD14_419_AA RVFSRVESFIEHQDTCTVRRSQPSNHLRHEQQQHTTNATQTASTAENNENGDSLIGPILP
*****

ATIDD14_333_AA GHPLQRRQSPPEQQPSTLLYPFVINGSELQLLPSRNCADETSLSLSIGTMDQKTMSEV
ATIDD14_419_AA GHPLQRRQSPPEQQPSTLLYPFVINGSELQLLPSRNCADETSLSLSIGTMDQKTMSEV
*****

ATIDD14_333_AA EKKSYEKGETSLEREEARRETKRQIEIAELEFAEAKRIRQHARAELHKAHLFREEASPRI
ATIDD14_419_AA EKKSYEKGETSLEREEARRETKRQIEIAELEFAEAKRIRQHARAELHKAHLFREEASPRI
*****

ATIDD14_333_AA SATMMQITCHNCKQHFQAPAAALVPPPPQTHCTDESTSLAVSYMSSATTEGEKASDRASS
ATIDD14_419_AA SATMMQITCHNCKQHFQAPAAALVPPPPQTHCTDESTSLAVSYMSSATTEGEKASDRASS
*****

```

Abbildung 3.12: Sequenzvergleich der beiden Spleißvarianten von ATIDD14.

Die putative Kernlokalisationssequenz der 419 Aminosäuren langen Variante ist grau hinterlegt.

Eine nukleäre Lokalisation dieses Transkriptionsfaktors wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht gezeigt (siehe Abbildung 3.11, P-R). Ein Sequenzvergleich der beiden Spleißvarianten zeigte, dass bei der kürzeren in dieser Arbeit verwendeten Version die putative Kernlokalisationssequenz fehlt (siehe Abbildung 3.12).

3.5 Untersuchung des mitochondrialen Proteoms von *Arabidopsis thaliana* unter Hypoxieeinfluss

Funktion und Häufigkeit von mitochondrial lokalisierten Proteinen werden vielfältig reguliert. Neben der Transkriptionsebene (Kleffmann et al., 2004) sind weitere Mechanismen wie die Kontrolle der organellären Genexpression (Leon et al., 1998; Choquet und Wollman, 2002), der posttranslationale Proteinimport (Glaser et al., 1998; Taylor et al., 2003a) und die korrekte Faltung und Anordnung der Proteine in den Hüllmembranen daran beteiligt (Leister, 2005). Möglicherweise spielen die mitochondriale RNA-Edierung sowie das *cis*- und *trans*-Spleißen von Introns der Gruppe II ebenfalls eine Rolle in diesem Prozess (Hinrichsen et al., 2009). Diese Vorgänge werden bei Analysen des Transkriptoms nicht berücksichtigt. Aus diesem Grund ist es sinnvoll, Untersuchungen in Bezug auf das Vorkommen von durch

biotischen oder abiotischen Stress regulierten Proteinen auch auf Proteomebene durchzuführen. Bei Reiskeimlingen wurden bereits mögliche Veränderungen der Zusammensetzung des mitochondrialen Proteoms unter Anoxie untersucht (Millar et al., 2004). Für dikotyle Pflanzen fehlen bisher derartige Analysen, weshalb die Anzahl an anoxie- bzw. hypoxiebeeinflussten mitochondrialen Proteinen hier noch nicht bekannt ist. In dieser Studie wurde daher die Auswirkung von Hypoxie auf das mitochondriale Proteom von *A. thaliana* mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese und anschließender Massenspektrometrie untersucht. Die als Ausgangsmaterial verwendeten Zellkulturen wurden im Dunkeln kultiviert. Auf diese Weise wurde die Ausbildung von funktionellen Chloroplasten verhindert, so dass kein photosynthetischer Sauerstoff gebildet werden konnte.

3.5.1. Eine zweifache Aufreinigung erhöht die Reinheit pflanzlicher Mitochondrien

Eine exakte Untersuchung des mitochondrialen Proteoms ist von möglichst reinen Mitochondrien als Ausgangsmaterial abhängig. Eine Kontamination mit Plastiden oder anderen Kompartimenten ist daher zu vermeiden. Aus diesem Grund wurde die von Kempken et al., 2007 und Bolle et al., 2007 entwickelte Methode zur Isolierung pflanzlicher Mitochondrien für eine Analyse des mitochondrialen Proteoms optimiert. Als Ausgangsmaterial für diese Untersuchung wurden Infloreszenzen von *Brassica oleracea* var. *botrytis* verwendet, da diese ähnlich wie im Dunkeln angezogenen *A. thaliana*-Zellsuspensionen keine funktionellen Chloroplasten besaßen. Sie konnten weiterhin in gleichbleibender Qualität in örtlichen Supermärkten erworben werden, so dass die Anzuchtphase entfiel. Sowohl *A. thaliana* als auch *Brassica oleracea* var. *botrytis* gehören zur Familie der Kreuzblütler (*Brassicaceae*) so dass aufgrund des Verwandtschaftsgrades die Ergebnisse dieser Untersuchung übertragbar sein sollten. Die Isolierung der Mitochondrien erfolgte zur Vermeidung einer möglichen plastidären Kontamination zweimal in Folge über einen Saccharosedichtegradienten. Zur Kontrolle wurde die mitochondriale Fraktion einmal über einen Saccharosedichtegradienten aufgereinigt. Jeweils 20 µg Gesamtprotein der Mitochondrienfraktionen aus beiden Versuchen wurden auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und mit Hilfe der Western Blot-Methode analysiert. Zur Detektion eventueller plastidärer Kontaminationen wurde der Primärantikörper Anti-E37 verwendet, der gegen die MPBQ/MSBQ-Methyltransferase aus *A. thaliana* gerichtet ist.

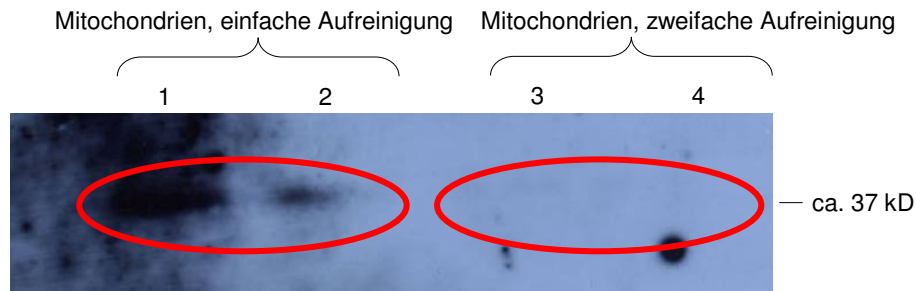
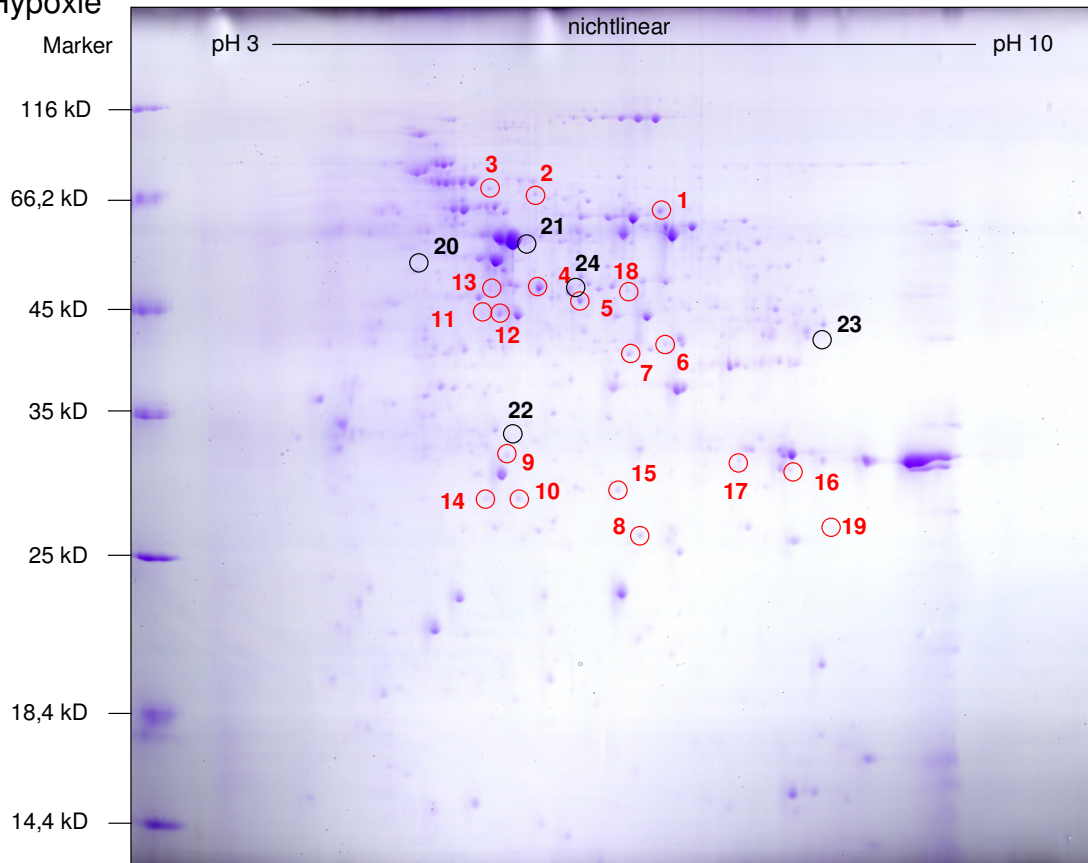


Abbildung 3.13: Western Blot-Analyse zur Untersuchung der Reinheit von Mitochondrien aus *B. oleracea* var. *botrytis*. Der verwendete Antikörper Anti-E37 ist gegen die 37 kDa große in der inneren Plastidenhüllmembran lokalisierte MPBQ/MSBQ-Methyltransferase aus *A. thaliana* gerichtet. Auf die Spuren 1 und 2 wurden jeweils 20 µg einfach aufgereinigtes mitochondriales Gesamtprotein aufgetragen. Auf die Spuren 3 und 4 wurden jeweils 20 µg zweifach aufgereinigtes mitochondriales Gesamtprotein aufgetragen. Die Belichtungszeit des Films betrug 2 min. Die Spuren 1 und 2 zeigen eine deutliche Bande von etwa 37 kDa. In den Spuren 3 und 4 ist keine derartige Bande zu sehen.

Diese ist in der inneren Plastidenhüllmembran lokalisiert und besitzt eine Größe von 37 kDa. Sie kommt in allen Arten von Plastiden und somit auch in nicht-grünem Gewebe vor (Teyssier et al., 1996) und eignet sich daher für den Nachweis plastidärer Kontaminationen. Für dieses Protein wurden Orthologe in allen Datenbanken für vaskuläre und nichtvaskuläre Pflanzen gefunden (Cheng et al., 2003). Da es sich bei *A. thaliana* und *B. oleracea* var. *botrytis* um verwandte Arten handelt, könnte Anti-E37 möglicherweise eine eventuelle plastidäre Kontamination der Mitochondrienfraktionen detektieren. Auf dem Western Blot war in den Spuren 1 und 2, die das Gesamtprotein der über einen einfachen Saccharosedichtegradienten aufgereinigten Mitochondrienfraktion enthielten, jeweils eine Bande von etwa 37 kDa zu erkennen (siehe Abbildung 3.13). Diese entsprach der Größe der plastidären Methyltransferase aus *A. thaliana* und stellt vermutlich deren Ortholog in *B. oleracea* var. *botrytis* dar. Diese Bande fehlte bei den Spuren 3 und 4, welche Gesamtprotein der zweifach aufgereinigten Mitochondrienfraktion enthielten. Diese Ergebnisse wurden durch eine dreimalige Wiederholung des Experiments bestätigt. Daher wurden bei allen folgenden Experimenten aufgrund der sichtbaren Verringerung der plastidären Kontamination Mitochondrien zweifach aufgereinigt. Nach Abschluss der Voruntersuchungen wurden alle folgenden Experimente mit *A. thaliana*-Zellkulturen zwölf Tage nach der letzten Subkultivierung durchgeführt. Nach dreistündiger Inkubation unter Hypoxie wurde das Zellmaterial geerntet. Die Isolierung der Mitochondrien erfolgte unter Sauerstoffausschluss in einem Anaerobenzelt des Instituts für Allgemeine Mikrobiologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. Zellkulturen der Kontrolle wurden im Schüttler belassen. Die Isolierung der Mitochondrien erfolgte in diesem Fall unter normoxischen Bedingungen. Im Anschluss daran wurde das Gesamtprotein zur weiteren Analyse aufgereinigt.

I. Hypoxie



II. Normoxie

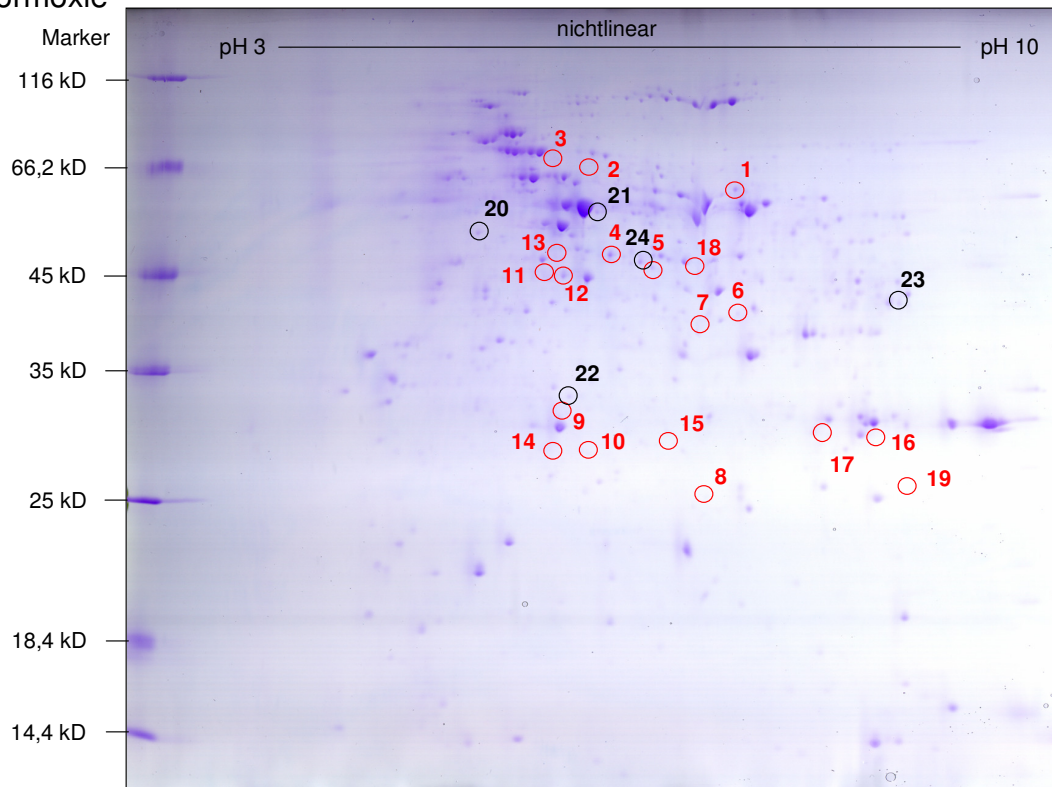


Abbildung 3.14: Auf SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrenntes mitochondriales Gesamtprotein aus *A. thaliana*-Zellkulturen nach dreistündigem Hypoxieversuch (I.) und normoxische Kontrolle (II.). Aufgetragen wurden 350 µg Gesamtprotein. Auf dem Gel der hypoxischen Probe ausgeprägtere Spots sind rot, auf dem Gel der Kontrolle ausgeprägtere Spots schwarz eingekreist.

3.5.2 Die Auftrennung des mitochondrialen Gesamtproteins durch zweidimensionale Gelelektrophorese führt zur Identifizierung von 24 hypoxiebeeinflussten Proteinspots

Die Bestandteile des mitochondrialen Gesamtproteins wurden durch zweidimensionale Gelelektrophorese anhand ihres isoelektrischen Punktes und ihrer Größe auf SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Die Visualisierung der Proteine erfolgte durch Coomassie-Färbung. Nach einem Vergleich wurden auf dem Gel der hypoxischen Probe neunzehn Spots identifiziert, die in der normoxischen Kontrolle nicht zu finden oder weniger stark ausgeprägt waren (siehe Abbildung 3.14). Auf dem Gel der Kontrolle befanden sich fünf Spots, die auf dem Gel der hypoxischen Probe nicht zu finden oder weniger stark ausgeprägt waren. Das Experiment wurde fünf Mal durchgeführt, wobei die Ergebnisse reproduziert wurden.

3.5.3. Eine Analyse der Proteinspots mittels MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometrie führt zur Identifizierung von elf hypoxiebeeinflussten Proteinen

Zur Identifizierung der unter 3.5.2 bestimmten Proteine wurde eine massenspektrometrische Analyse durchgeführt. Durch einen Vergleich der erhaltenen Daten mit den Sequenzen von in Datenbanken vorliegenden Proteinen mit dem Programm *Mascot* (Perkins et al., 1999) wurde die Identität der Proteine ermittelt (Liu et al., 2007; Duncan et al., 2008). Die Zuordnung der durch massenspektrometrische Analyse identifizierten Peptide wurde als signifikant betrachtet, wenn die von *Mascot* ermittelte Gesamtheit der Datenbankeinträge (*total protein score*) einen Wert ≥ 70 besaß und die daraus berechnete Wahrscheinlichkeit der Richtigkeit dieser Zuordnung $\geq 95\%$ war. Es wurden elf hypoxiebeeinflusste Peptide identifiziert. Bei Hypoxie vermehrt vorkommend waren das stomatinartiges Protein ATSLP-mito (At4g27585), die 2,3-biphosphoglyceratunabhängige Phosphoglyceratmutase ATPGAM-i-cyto (At3g08590), die Oxidoreduktase ATB2 (At1g60710), die Glutathion-S-Transferase AtGSTF6 (At1g02930), die beiden S-Adenosylmethionintransferasen MAT2 und MAT3 (At4g01850, At2g36880), die Proteindisulfidisomerase PDIL2-1 (At2g47470), die Triosephosphatisomerase ATCTIMC (At3g55440) und das nukleinsäurenbindende Peptid BPA1 (At5g16840).

Tabelle 3.4: Durch massenspektrometrische Analysen identifizierte hypoxiebeeinflusste Proteine.

Die Nomenklatur für die 2,3-bisphosphoglyceratunabhängige Phosphoglyceratmutase sowie für das stomatinartige Protein wurde aufgrund der bisher fehlenden Charakterisierung in dieser Arbeit erstellt und wird auch in den folgenden Abschnitten verwendet. Alle anderen Abkürzungen sowie Beschreibungen sind der Datenbank TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>) entnommen. Die aus den Spots 2 bis 13 isolierten Proteine kamen bei hypoxischen Bedingungen, die aus den Spots 20 bis 22 isolierten Proteine bei normoxischen Bedingungen vermehrt vor.

Spot	Identifizierungsnummer	Molekulargewicht (kDa)	pI	AGI-Nr.	Beschreibung	Lokalisation	Funktion
2	gij15231939	60,897	5,53	At3g08590	2,3-bisphosphoglyceratunabhängige Phosphoglyceratmutase (ATPGAM-i-cyto)	Apoplast, Cytosol	Glykolyse, Glukoneogenese
4	gij222424639	33,7634	5,6	At4g01850	S-Adenosylmethionintransferase 2 (MAT2)	Cytosol	kupferionenbindend
5	gij18417021	45,0492	6,35	At4g27585	stomatinartiges Protein (ATSLP-mito)	Mitochondrien, Plastiden, Membran	Signalgebung, programmierter Zelltod, Regulation der Ionenkanalaktivität
6	gij18406861	38,3567	5,92	At1g60710	Oxidoreduktase (ATB2)	Cytosol, Mitochondrien	Cadmiumstress, Oxidoreduktaseaktivität
8	gij15218640	23,4712	5,8	At1g02930	Gluthathion-S-Transferase (AtGSTF6)	Mitochondrien, Zellwand, Vakuole, Cytosol	Stressantwort, Detoxifizierung, bei ATP-Mangel hochreguliert
9	gij145334501	27,0026	5,46	At5g16840	nukleinsäurenbindendes Protein, Bindungspartner von ADC11 (BPA1)	Cytosol, Mitochondrien	bindet an Nukleinsäuren und an ADC11
10	gij414550	27,3661	5,24	At3g55440	cytosolische Triosephosphatisomerase (ATCTIMC)	Mitochondrien, Cytosol	kupferionenbindend, Salzstress, Glykolyse
13	gij15228048	42,9267	5,76	At2g36880	S-Adenosylmethionintransferase 3 (MAT3)	Plasmamembran	Methioninbiosynthese
20	gij110742192	50,1215	4,96	At1g50010, At1g04820	Tubulin-alpha-2-alpha 4-Kette (TUA2-4)	Zellwand, Chloroplasten, Plasmamembran, Cytosol	Cytoskelett
21	gij14334534	54,2174	6,16	At3g16480	Alpha-Untereinheit der Mitochondrialen Prozessierende Peptidase (MMPα)	innere/äußere mitochondriale Membran, Intermembranraum, Matrix	Proteinimport
22	gij42571269	29,541	5,52	At2g47470	Proteinindisulfidomerase (PDIL 2-1)	Endoplasmatisches Retikulum	Disulfidisomeraseaktivität, cadmiumionenbindend, Thioredoxinfunktion

Unter hypoxischen Bedingungen weniger häufig waren die Tubulin- α -2- α -4-Kette TUA2-4 (*TUA2*, At1g50010 und *TUA4*, At1g04820) und die α -Untereinheit der mitochondrialen prozessierenden Peptidase MPP (At3g16480). Eine entsprechende Übersicht der Proteine ist in Tabelle 3.4 aufgeführt.

3.5.4 *In silico* Expressionsstudien der entsprechenden Gene

Anhand des *Arabidopsis* *eFP-Browsers* (Winter et al., 2007) wurde die gewebe- und entwicklungsspezifische Expression der für diese Proteine kodierenden Gene bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.5 aufgeführt.

Tabelle 3.5: Gewebe- und entwicklungsspezifische Expression der für die unter 3.4.3 identifizierten hypoxieregulierten Proteine kodierenden Gene.

Die Expression wurde auf der Basis von Microarray-Daten mit dem *Arabidopsis* *eFP-Browser* ermittelt (Schmid et al., 2005; Winter et al., 2007; siehe Anhang Abbildungen A5 A, K, L, M, N, O, P, Q, R,S,T, U).

Protein	Beschreibung	AGI-Nr.	gewebe- und entwicklungsspezifische Expression
ATSLP-mito	stomatinartiges Protein	At4g27585	Gesamte Pflanze, erhöhte Werte in vegetativer Rosette, Blüte, Apikalmeristem
ATPGAM-i-cyto	2,3-biphosphoglyceratunabhängige Phosphoglyceratmutase	At3g08590	Gesamte Pflanze, erhöhte Werte in Blüte, Embryo
ATB2	Oxidoreduktase	At1g60710	Gesamte Pflanze, erhöhte Werte in Hypokotyl, Stängel, Blüte
ATGSTF6	Glutathion-S-Transferase	At1g02930	Gesamte Pflanze, erhöhte Werte in Kotyledonen, seneszenten Blättern
MAT2	S-Adenosylmethionintransferase	At4g01850	Gesamte Pflanze, erhöhte Werte im Stängel
MAT3	S-Adenosylmethionintransferase	At2g36880	Gesamte Pflanze, erhöhte Werte im Stängel, Pollen
PDIL2-1	Proteindisulfidisomerase	At2g47470	Gesamte Pflanze, erhöhte Werte in Blüte, Embryo, Samen, Apikalmeristem
ATCTIMC	Triosephosphatisomerase	At3g55440	Gesamte Pflanze
TUA2-4	Tubulin- α -2- α -4-Kette	At1g50010 (<i>TUA2</i>)	Pollen
„	„	At1g04820 (<i>TUA4</i>)	Gesamte Pflanze, erhöhte Werte im Pollen, Apikalmeristem

Tabelle 3.5: Gewebe- und entwicklungsspezifische Expression der für die unter 3.4.3 identifizierten hypoxieregulierten Proteine kodierenden Gene (Fortsetzung).

Protein	Beschreibung	AGI-Nr.	gewebe- und entwicklungsspezifische Expression
MPP α	α -Untereinheit der mitochondrialen prozessierenden Peptidase	At3g16480	Gesamte Pflanze, erhöhte Werte im Samen, Apikalmeristem
BPA1	nukleinsäurenbindendes Peptid	At5g16840	Gesamte Pflanze, erhöhte Werte in Stamen, Embryo, Samen

Demnach werden alle Gene mit Ausnahme von *TUA2* in der gesamten Pflanze exprimiert. Erhöhte Werte treten bei *ATSLP-mito* in der vegetativen Rosette, im Apikalmeristem und in der Blüte auf. Die Expression von *ATPGAM-i-cyto* ist in der Blüte und im Embryo erhöht. Das Gen der Oxidoreduktase *ATB2* wird vermehrt im Hypokotyl, im Stängel und in der Blüte exprimiert. Für *ATGSTF6* sind erhöhte Transkriptraten in den Kotyledonen und in seneszenten Blättern zu finden. Die Gene der S-Adenosylmethionintransferasen *MAT2* und *MAT3* zeigen erhöhte Expressionswerte im Stängel und im Pollen. *PDIL2-1* wird im Apikalmeristem, in der Blüte sowie im Embryo und im Samen verstärkt exprimiert. Für die beiden Gene der Tubulin- α -2- α -4-Kette, *TUA2* und *TUA4*, sind erhöhte Transkriptraten im Pollen und Apikalmeristem zu beobachten. *MPP α* wird im Samen und im Apikalmeristem vermehrt exprimiert, während das Gen des nukleinsäurenbindenden Peptids *BPA1* im Stamen, im Embryo und im Samen erhöhte Transkriptraten aufweist.

3.5.5. Die mitochondrial lokalisierten Proteine ATSLP-mito und AtGSTF6 sowie die möglicherweise mitochondrial assoziierten Proteine TUA4 und ATPGAM-i-cyto werden auf Transkriptionsebene durch Hypoxie reguliert

Zur Überprüfung einer möglichen hypoxiebeeinflussten Regulierung der unter 3.5.3 identifizierten Proteine auf Transkriptionsebene erfolgte eine Analyse der Genexpression durch quantitative Real Time PCR. Als Ausgangsmaterial wurde aus dreistündigen Hypoxieversuchen sowie aus der normoxischen Kontrolle stammende Gesamt-RNA aus Zellkulturen der Linie MM1 verwendet. Neben den Genen der drei mitochondrial lokalisierten Proteine ATSLP-mito, ATGSTF6 und MPP α wurden aufgrund der möglichen mitochondrialen Assoziation von ATPGAM-i-cyto, ATCTIMC sowie TUA2-4 auch die Transkriptraten der entsprechenden Gene untersucht. Da die Gene *TUA2* (At1g50010) und

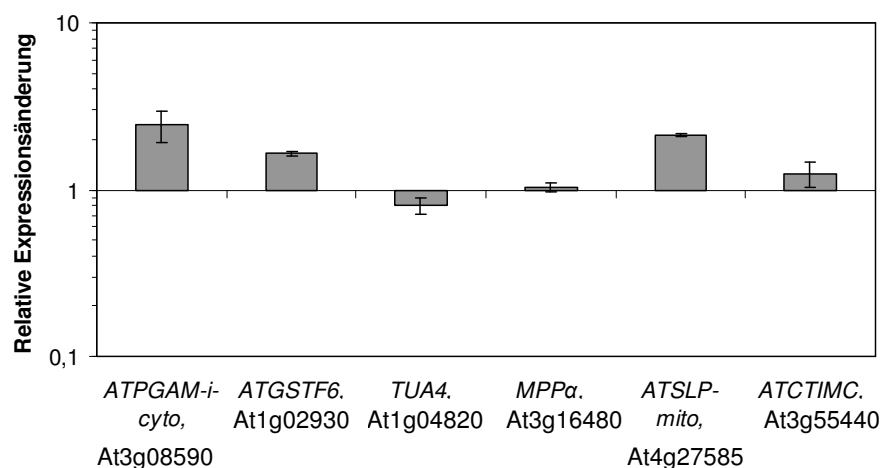


Abbildung 3.15: Expression der Gene der mitochondrial lokalisierten und möglicherweise assoziierten Proteine unter Hypoxieeinfluss.

Die verwendete Gesamt-RNA stammte aus Zellkulturen, die zehn Tage nach der letzten Subkultivierung für 3 h einer N_2/CO_2 -Atmosphäre ausgesetzt wurden. Gezeigt ist die logarithmische Darstellung der x-fachen relativen Expression im Vergleich zur normoxischen Kontrolle. Der Wert der Kontrolle beträgt immer 1, bei Werten größer oder kleiner als 1 ist die Expression der entsprechenden Gene herauf- oder herunterreguliert. Die Normalisierung erfolgte mit den Haushaltsgenen *TIP2*, *EF1-alpha* und *GAPB*.

TUA4 (At4g04820) der Tubulin-alpha-2-alpha-4-Kette für identische Proteine kodieren (Annotationen der Datenbank TAIR, <http://www.arabidopsis.org/>), wurde für dieses Experiment aufgrund seiner Expression in der gesamten Pflanze das Gen *TUA4* untersucht. Die Expression von *TUA2* findet nur im reifen Pollen statt, so dass eine Bestimmung der Transkriptrate in Zellkulturen unter Umständen erschwert sein könnte. Die Gene der übrigen Proteine wurden nicht untersucht, da entweder keine weiteren Hinweise auf mitochondrielle Lokalisation oder Assoziation erbracht wurden oder eine Untersuchung mit *Genevestigator* (Zimmermann et al., 2004) keine Beeinflussung der Transkriptrate durch Hypoxie zeigte. Die Expression von *PGAM-i-cyto*, *ATGSTF6* und von *ATSLP-mito* war bei Hypoxie im Vergleich zur normoxischen Kontrolle hochreguliert (2,33fach \pm 0,522; 1,648fach \pm 0,048; 2,136fach \pm 0,052; siehe Abbildung 3.15). Das Gen der Tubulin-alpha-4-Kette wurde bei Sauerstoffmangel herunterreguliert (0,798fach \pm 0,094). Die Expression der für *MPPα* und die Triosephosphatisomerase *ATCTIMC* kodierenden Gene wies keine Veränderung auf.

Somit wurden elf hypoxieregulierte Proteine identifiziert, von denen *ATSLP-mito*, *AtGSTF6*, *BPA1*, *ATB2* und *MPPα* mitochondrial lokalisiert und *PGAM-i-cyto*, *ATCTIMC* und *TUA2-4* möglicherweise mitochondrial assoziiert sind. Für *PGAM-i-cyto*, *AtGSTF6*, *TUA4* und von *ATSLP-mito* wurde weiterhin eine Regulierung durch Hypoxie auf der Transkriptionsebene nachgewiesen, während die Expression der für die *MPPα* und die Triosephosphatisomerase kodierenden Gene durch Hypoxie nicht beeinflusst wurde.

3.6 Charakterisierung von T-DNA-Insertionsmutanten hypoxiebeeinflusster Gene

Pflanzen haben während der Evolution Systeme zur Wahrnehmung und Signaltransduktion von Sauerstoffmangel entwickelt, die eine Anpassung an hypoxische Umweltbedingungen erlauben (Rhoads und Subbaiah, 2007). In dieser Arbeit wurden in *A. thaliana* verschiedene hypoxiebeeinflusste Proteine identifiziert, die möglicherweise an der Wahrnehmung von Sauerstoffmangel und der Weiterleitung des entsprechenden Signals beteiligt sind oder die Toleranz der Pflanze gegenüber hypoxischem Stress erhöhen. Zur Untersuchung der Funktion eines Proteins im Zusammenhang mit Wachstum und Entwicklung der gesamten Pflanze reichen Analysen des Transkriptoms und Proteoms nicht aus. Weiterführende Studien beinhalten daher oft das Ausschalten (*knock-out*) des entsprechenden Gens. Durch eine Analyse des Phänotyps einer Mutante, bei der das Gen durch die Insertion der T-DNA-Region von *Agrobacterium tumefaciens* funktionsunfähig gemacht wurde (Alonso et al., 2003), lassen sich so Rückschlüsse auf eine mögliche Funktion des Proteins ziehen. Für erste Hinweise auf eventuelle entwicklungsbezogene Funktionen der in den vorherigen Experimenten identifizierten hypoxiebeeinflussten Proteine wurden daher entsprechende T-DNA-Insertionsmutanten charakterisiert.

3.6.1 Identifizierung von T-DNA-Insertionsmutanten

Zur Identifizierung von T-DNA-Insertionsmutanten von Genen der kleinen mitochondrialen Hitzeschockproteine ATHSP26.3-mito und ATHSP22-mito, des Transkriptionsfaktors ATIDD14, des calmodulinartigen Proteins CML38, der putativen Helikase PHL, der Isoform 1a der Alternativen Oxidase AOX1a, der kalziumabhängigen Proteinkinasen CPK22 und CPK23, der 2,3-biphosphoglyceratunabhängigen Phosphoglyceratmutase ATPGAM-i-cyto und des stomatinartigen Proteins ATSLP-mito wurden entsprechende Linien der SALK- und SAIL-Kollektion (Alonso et al., 2003; Sessions et al., 2002) auf Homozygotie selektiert. Für den Locus des kleinen mitochondrialen Hitzeschockproteins ATHSP23.6-mito (At4g25200) war keine T-DNA-Insertionsmutante verfügbar. Für ATHSP26.3-mito, ATHSP22-mito, CPK22, CPK23 und ATSLP-mito wurden die homozygoten Insertionslinien *athsp26.3-mito*, *athsp22-mito*, *cpk22*, *cpk23* und *atslp-mito* isoliert.

Tabelle 3.6: Übersicht der in dieser Arbeit identifizierten T-DNA-Insertionsmutanten.

Gen	AGI-Nr.	Bezeichnung der Mutante	Linie	T-DNA-Insertion	Bereich	Einfluss auf Genexpression
<i>ATHSP26.3-mito</i>	At1g52560	<i>athsp26.3-mito</i>	SALK_049834	-225 bp	5'UTR	<i>knock-out</i>
<i>ATHSP22-mito</i>	At5g51440	<i>athsp22-mito</i>	SALK_118536	+250 bp	1. Intron	<i>knock-out</i>
<i>CPK22</i>	At4g04710	<i>cpk22</i>	SALK_136629	+49 bp	1. Exon	<i>knock-down</i>
<i>CPK23</i>	At4g04740	<i>cpk23</i>	SALK_007958	+2070 bp	7. Intron	<i>knock-out</i>
<i>ATSLP-mito</i>	At4g27585	<i>atslp-mito</i>	SAIL_210_D11	+2478 bp	9. Exon	<i>knock-down</i>

Bei den aus den Samen der übrigen fünf SALK-Insertionslinien gezogenen Pflanzen wurde keine T-DNA-Insertion nachgewiesen. Bei diesen Linien wird von einer fehlerhaften Annotation des T-DNA-Insertionsorts oder von multiplen Insertionen mit letalem Effekt ausgegangen. Eine Überprüfung der Transkriptraten zeigte bei den Linien *cpk22* und *atslp-mito* reduzierte Transkriptmengen der entsprechenden Gene, während in *athsp26.3-mito*, *athsp22-mito* und *cpk23* kein Transkript mehr nachgewiesen wurde. Somit handelt es sich bei *cpk22* und *atslp-mito* um *knock-down* Linien, bei denen von einer reduzierten Menge des entsprechenden Proteins ausgegangen wird. *Athsp26.3-mito*, *athsp22-mito* und *cpk23* stellen *knock-out* Linien dar. Eine Übersicht der T-DNA-Mutanten mit den genauen Insertionsorten ist in Tabelle 3.6 aufgeführt. Die Ergebnisse der entsprechenden PCR-Reaktionen sind im Anhang der Arbeit zu finden.

3.6.2 Phänotypische Analyse von Keimlingen unter Hypoxieeinfluss

Der Einfluss von Hypoxie auf die frühe Entwicklung wurde anhand sieben Tage alter Keimlinge der unter 3.6.1 identifizierten T-DNA-Insertionsmutanten untersucht. Die Keimlinge wurden auf Nährmedium auf je zwei Petrischalen pro Linie angezogen, wobei 32 Samen pro Platte ausgebracht wurden. Die Kultivierung erfolgte unter Langtagbedingungen mit einer Photoperiode von LD 16/8 h und 25 °C. Nach sieben Tagen wurde die Anzahl der ausgekeimten Pflanzen pro Linie bestimmt. Bei den Wildtyp-Pflanzen keimten durchschnittlich 31, $25 \pm 0,5$ von 32 Samen (siehe Abbildung 3.16). Die Anzahl gekeimter Samen der Linien *cpk23* und *atslp-mito* war mit 21, $5 \pm 6,24$ bzw. 26, $5 \pm 6,13$ signifikant geringer als die des Wildtyps. Die Samen der übrigen Linien wiesen keinen Unterschied zum Wildtyp auf.

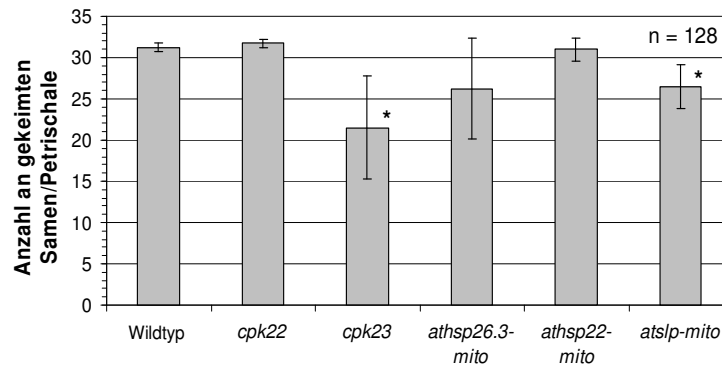


Abbildung 3.16: Anzahl gekeimter Samen des Wildtyps und der T-DNA-Insertionsmutanten.

n: Anzahl der ausgebrachten Samen pro Linie. Die Keimlinge wurden in Nährmedium auf je zwei Petrischalen pro Linie unter Langtagbedingungen angezogen. Je Petrischale wurden 32 Samen ausgebracht. Die Keimlinge waren bei der Auswertung sieben Tage alt. Der Versuch wurde zweimal durchgeführt. Mit * markierte Daten zeigten nach Durchführung eines t-Tests einen signifikanten Unterschied zum Wildtyp.

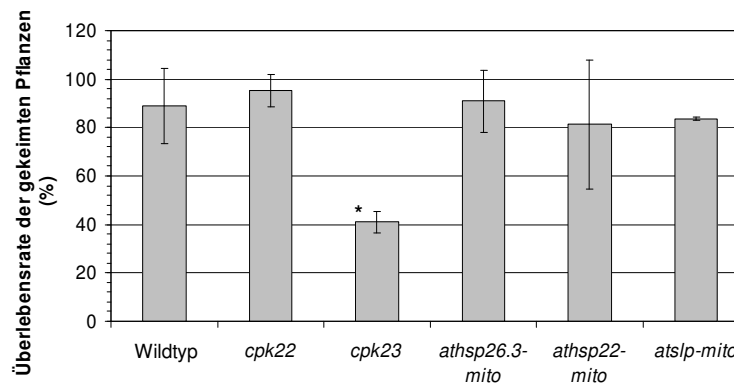


Abbildung 3.17: Überlebensrate von 14 Tage alten begasten Wildtyp-Pflanzen und T-DNA-Insertionsmutanten.

Die Pflanzen wurden in Nährmedium auf Petrischalen unter Standardbedingungen angezogen. Pro Schale und Linie wurden 32 Samen ausgebracht. Die Begasung mit N_2 zur Erzeugung von Hypoxie erfolgte im Alter von sieben Tagen bei 25 °C unter Lichtausschluss und dauerte zwei Tage. Die Dokumentation der Pflanzen erfolgte nach weiteren fünf Tagen Kultivierung unter Langtagbedingungen. Der Versuch wurde zweimal durchgeführt. Die Überlebensrate berechnet sich aus der Anzahl an gekeimten Pflanzen und der Anzahl an Pflanzen, welche die Begasung überlebten. Mit * markierte Daten zeigten nach Durchführung eines t-Tests einen signifikanten Unterschied zum Wildtyp.

Im Anschluss wurden die Petrischalen in einen luftdichten Behälter überführt und für zwei Tage zur Erzeugung von Hypoxie unter Lichtausschluss bei 25 °C mit N_2 begast. Der Sauerstoffgehalt der Atmosphäre in dem Behälter betrug während dieser Zeit etwa 0,3% - 0,5%. Keimlinge der Kontrolle wurden bei 25 °C unter Lichtausschluss und normoxischen Bedingungen kultiviert. Die Dokumentation erfolgte nach weiteren fünf Tagen Kultivierung unter Langtagbedingungen. Es überlebten 89,01% \pm 15,47% der Wildtyp-Pflanzen (siehe Abbildung 3.17). Die Überlebensrate von Pflanzen der Linie *cpk23* war mit 40,97% \pm 4,29 signifikant geringer als die des Wildtyps. Die Pflanzen übrigen Linien zeigten keinen Unterschied zum Wildtyp. Weiterhin wurde die Länge der Pflanzen von der Spitze der

Hauptwurzel bis zum Apikalmeristem bestimmt. In der Kontrolle wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen T-DNA-Insertionsmutanten und Wildtyp-Pflanzen beobachtet (siehe Abbildung 3.18). Begaste Pflanzen der Linie *cpk23* besaßen eine durchschnittliche Länge von $2,5 \text{ cm} \pm 0,91 \text{ cm}$ und waren geringfügig kürzer als begaste $4,3 \text{ cm} \pm 0,63 \text{ cm}$ lange Wildtyp-Pflanzen. Die begasten Pflanzen der übrigen vier Linien wiesen keine Unterschiede zum Wildtyp auf. Pflanzen der Linien *cpk22* und *athsp26.3-mito* bildeten sowohl in der Kontrolle als auch bei Begasung mit N_2 zahlreiche laterale Wurzeln aus (siehe Abbildung 3.19). Dies wurde bei Pflanzen der Linie *athsp22-mito* nur in der Kontrolle beobachtet. Bei den Pflanzen dieser Linie trat in der Kontrolle ebenfalls eine verstärkte Chlorose der Blätter auf. Begaste Pflanzen der Linie *cpk23* hatten bei Versuchsende verglichen mit dem Wildtyp auffallend wenige laterale Wurzeln gebildet. Pflanzen der Linien *athsp26.3-mito* und *athsp22-mito* bildeten in der Kontrolle im Alter von 14 Tagen bereits die ersten Infloreszenzen. Bei den begasten Pflanzen dieser Linien sowie bei Wildtyp-Pflanzen wurde dies nicht beobachtet.

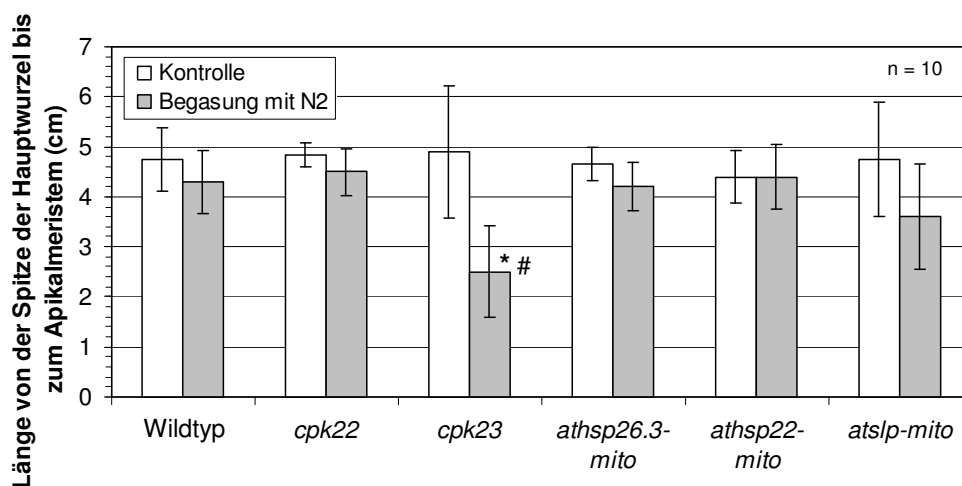


Abbildung 3.18: Länge von 14 Tage alten Wildtyp-Pflanzen und T-DNA-Insertionsmutanten fünf Tage nach der Begasung mit N_2 .

n: Anzahl der pro Linie und Bedingung vermessenen Pflanzen. Gemessen wurde die Länge von der Spitze der Hauptwurzel bis zum Apikalmeristem. Mit * markierte Daten waren nach Durchführung eines t-Tests signifikant unterschiedlich zum Wildtyp, mit # markierte Daten zeigten einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle.

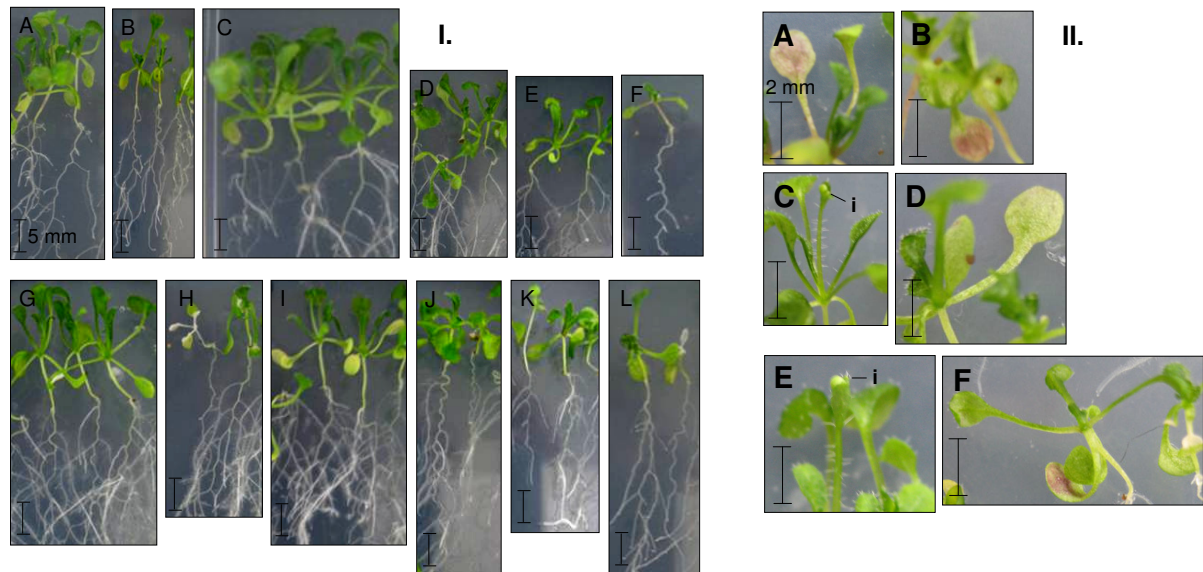


Abbildung 3.19: 14 Tage alte *A. thaliana*-Pflanzen fünf Tage nach Ende der Begasung.

I.: Gesamtübersicht. A, C, E, G, I, K: Kontrolle; B, D, F, H, J, L: Begasung. A, B: Wildtyp; C, D: *cpk22*; E, F: *cpk23*; G, H: *athsp26.3-mito*; I, J: *athsp22-mito*; K, L: *atslp-mito*. II. Infloreszenzen bei Pflanzen der Linien *athsp26.3-mito* und *athsp22-mito*. A, C, E: Kontrolle; B, D, F: Begasung. A, B: Wildtyp; C, D: *athsp26.3-mito*; E, F: *athsp22-mito*, i: Infloreszenz. Die Pflanzen wurden in Nährmedium auf Petrischalen unter Langtagbedingungen angezogen. Die Begasung mit N₂ zur Erzeugung von Hypoxie erfolgte im Alter von sieben Tagen bei 25 °C unter Lichtausschluss und dauerte zwei Tage. Nach Ende der Begasung erfolgte eine Kultivierung aller Pflanzen unter Langtagbedingungen für weitere fünf Tage bis zur Dokumentation. Die Balken entsprechen 5 mm (I.) und 2 mm (II.).

3.6.3 Phänotypische Analyse von Pflanzen unter Hypoxieeinfluss

Der Einfluss von Hypoxie auf die fortgeschrittene Entwicklung wurde anhand 14 Tage alter in Erde angezogener Pflanzen untersucht. Wegen der späteren Überflutung wurden die Pflanzen nicht vereinzelt, da diese bei den Vorversuchen durch das Wasser weggeschwemmt wurden. Da sich Größe und Gewicht der Samen nicht voneinander unterschieden, wurden pro Topf 10 mg Samen ausgebracht, um eine Homogenität des Versuchs zu gewährleisten. Die Kultivierung fand unter Langtagbedingungen statt. Zur Erzeugung von Hypoxie wurden die Pflanzen für vier Tage komplett geflutet. Pflanzen der Kontrolle wurden unter normoxischen Bedingungen bei 25 °C kultiviert. Zur Vermeidung der Sauerstoffproduktion durch Photosynthese fand der Versuch unter Lichtausschluss statt. Anschließend wurden die Pflanzen für weitere acht Wochen unter Langtagbedingungen kultiviert.

3.6.3.1 Morphologie der Pflanzen während der Anzuchtphase

Wildtyp-Pflanzen keimten 2, 67 ± 1 , 15 Tage nach der Aussaat. Pflanzen der Linie *cpk23* keimten nach 9 ± 1 Tagen und somit signifikant später als Wildtyp-Pflanzen. Bei den übrigen T-DNA-Insertionsmutanten wurden keine Unterschiede beobachtet (siehe Abbildung 20). Pflanzen der Linien *athsp26.3-mito*, *athsp22-mito*, *cpk22* und *cpk23* besaßen bei Beginn der Flutungsversuche im Alter von 14 Tagen vier bis sechs Blätter und unterschieden sich nicht vom Wildtyp (Daten nicht gezeigt). Pflanzen der Linie *atslp-mito* befanden sich nach dieser Zeit immer noch im Zweiblattstadium (siehe Abbildung 3.21).

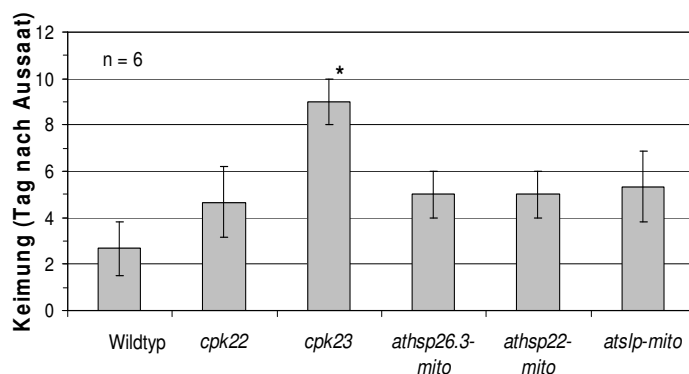


Abbildung 3.20: Zeitpunkt der Keimung von Wildtyp und T-DNA-Insertionsmutanten.

n: Anzahl der untersuchten Pflanzen pro Linie. Die Anzucht erfolgte in Erde unter Langtagbedingungen. Pflanzen wurden als gekeimt betrachtet, wenn das Hypokotyl die Erde durchstoßen hatte und sich die Kotyledonen entfaltet hatten. Mit * markierte Daten waren nach Durchführung eines t-Tests signifikant unterschiedlich zum Wildtyp.

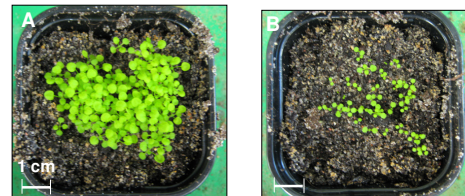


Abbildung 3.21: Phänotypischer Vergleich von 14 Tage alten Pflanzen.

A: Wildtyp, B: *atslp-mito*. Die Anzucht erfolgte in Erde unter Langtagbedingungen. Die Balken entsprechen 1 cm.

3.6.3.2 Beobachtungen zur Öffnung der Stomata

Die Öffnung der Stomata wurde im Anschluss an die viertägige unter Lichtausschluss stattfindende Überflutung untersucht. Die Pflanzen waren zu diesem Zeitpunkt 18 Tage alt. Zur Analyse wurden gesunde, unbeschädigte Rosettenblätter verwendet. Von diesen wurde mit durchsichtigem Nagellack ein Abdruck der Blattunterseite angefertigt. Dieser wurde nach dem Trocknen abgezogen und mittels Hellfeldmikroskopie bei 20-facher Vergrößerung bezüglich der Stomataöffnungen untersucht und dokumentiert. Pro Linie und Bedingung wurden fünf Pflanzen untersucht. Es wurden zehn Stomata pro Pflanze analysiert. Wildtyp-Pflanzen zeigten in der Kontrolle 2, 4 ± 1 , 34 und nach Überflutung 0, 8 ± 0 , 43 geöffnete

Stomata pro Pflanze (siehe Abbildungen 3.22 und 3.23). Pflanzen der Linie *cpk23* wiesen in der Kontrolle 7, 4 ± 0, 55 und nach Überflutung 7 ± 2, 24 geöffnete Stomata auf. Die Anzahl war somit bei dieser Linie signifikant erhöht. Die übrigen T-DNA-Insertionsmutanten unterschieden sich nicht vom Wildtyp. Bei Licht und normoxischen Bedingungen wurden zwischen T-DNA-Insertionsmutanten und Wildtyp keine signifikanten Unterschiede beobachtet.

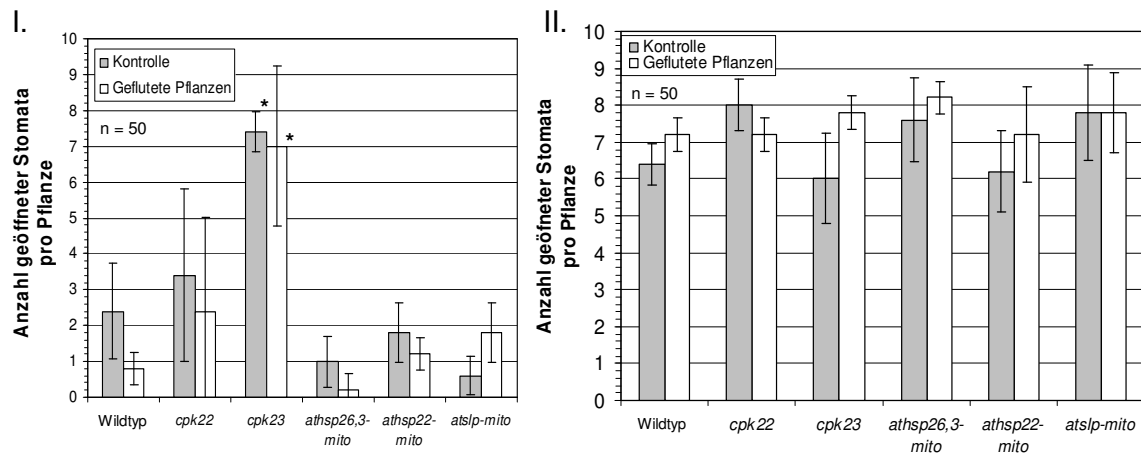


Abbildung 3.22: Anzahl geöffneter Stomata bei Wildtyp-Pflanzen und T-DNA-Insertionsmutanten

I.: direkt nach der viertägige Überflutung, II.: 24 Stunden später während der Tagperiode. n: Anzahl der pro Linie und Bedingung untersuchten Stomata. Pro Linie und Bedingung wurden fünf Pflanzen untersucht. Pro Pflanze wurden zehn Stomata analysiert. Mit * markierte Daten zeigten nach Durchführung eines t-Tests einen signifikanten Unterschied zum Wildtyp.

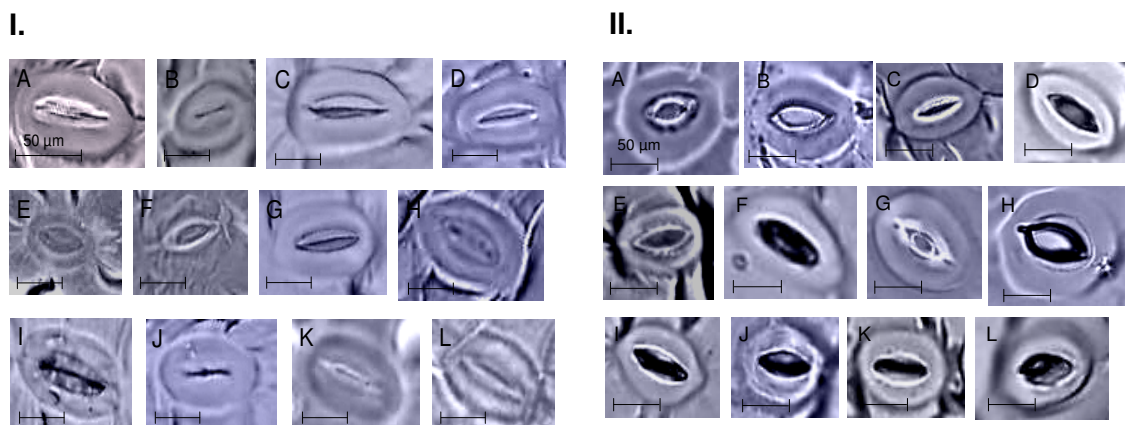


Abbildung 3.23: Exemplarische Abbildung der Stomata.

I.: direkt nach der viertägige Überflutung, II.: 24 Stunden später während der Tagperiode.

A, C, E, G, I, K: Kontrolle. B, D, F, H, J, L: Geflutete Pflanzen. A, B: Wildtyp; C, D: *cpk22*; E, F: *cpk23*; G, H: *athsp26,3-mito*; I, J: *athsp22-mito*; K, L: *atslp-mito*. Die Balken entsprechen 50 µm.

3.6.3.3 Morphologie der Pflanzen während der vegetativen Wachstumsphase und beim Übergang zur Blütenbildung

Bei gefluteten Pflanzen wurde eine verzögerte Entwicklung im Vergleich zur Kontrolle beobachtet (siehe Abbildung 3.24). Sie befanden sich zwölf Tage nach Durchführung des Hypoxieversuchs im Zwei- bis Vierblattstadium, während die Kontrolle vier bis acht Blätter aufwies. Die Blätter der gefluteten Pflanzen waren kleiner als die der Kontrollpflanzen.

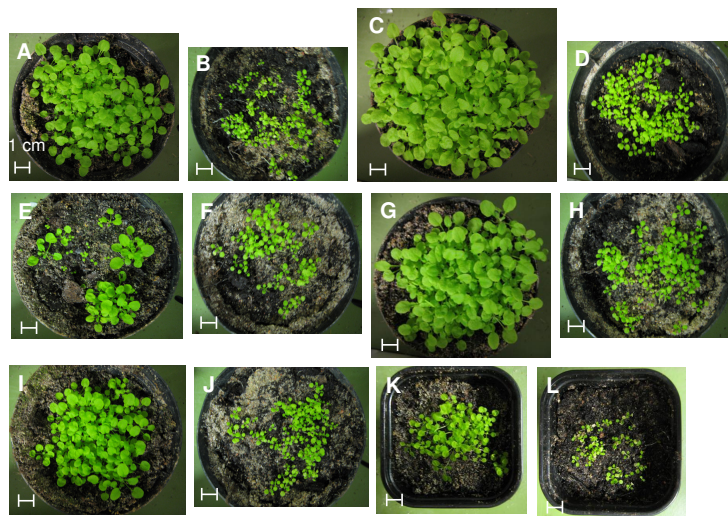


Abbildung 3.24: 26 Tage alte T-DNA-Insertionsmutanten zwölf Tage nach Überflutung.

A, C, E, G, I, K: Kontrolle; B, D, F, H, J, L: Geflutete Pflanzen. A, B: Wildtyp; C, D: *cpk22*; E, F: *cpk23*; G, H: *athsp26.3-mito*; I, J: *athsp22-mito*; K, L: *atslp-mito*. Die Flutung dauerte vier Tage. Alle Pflanzen wurden während dieser Zeit unter Lichtausschluss kultiviert. Anzucht sowie die Kultivierung nach der Flutung erfolgte unter Langtagbedingungen. Die Balken entsprechen 1 cm.

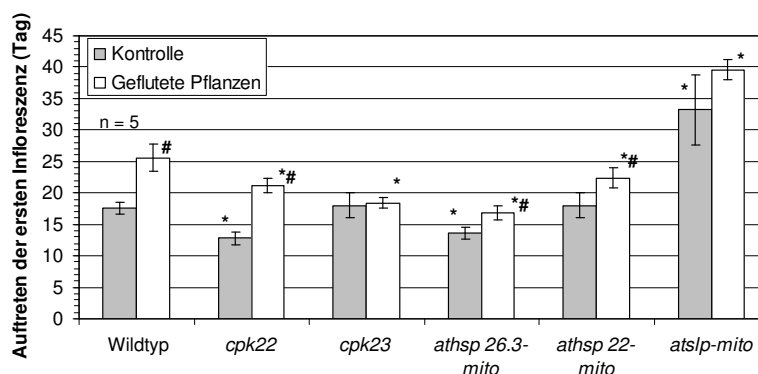


Abbildung 3.25: Auftritt der ersten Infloreszenz.

Gezählt wurden die Tage ab Ende der Überflutung. n: Anzahl der pro Linie und Bedingung untersuchten Pflanzen. Mit * markierte Daten waren nach Durchführung eines t-Tests signifikant unterschiedlich zum Wildtyp. Mit # markierte Daten waren signifikant unterschiedlich zur Kontrolle.

Die gefluteten Pflanzen bildeten mit Ausnahme der Linien *cpk23* und *atslp-mito* später Infloreszenzen als die Kontrolle (siehe Abbildung 3.25). Die ersten Infloreszenzen traten in der Kontrolle bei Pflanzen der Linien *cpk22* und *athsp26.3-mito* $12, 8 \pm 1, 1$ bzw. $13, 6 \pm 0, 89$ Tage nach Durchführung der Überflutung auf. Beim Wildtyp wurden in der Kontrolle nach $17, 6 \pm 0, 89$ Tagen und bei Pflanzen der Linien *cpk23* und *athsp22-mito* nach 18 ± 2 Tagen die ersten Infloreszenzen beobachtet. Pflanzen der Linie *atslp-mito* zeigten mit $33, 2 \pm 5, 59$ Tagen die ersten Infloreszenzen. Geflutete Wildtyp-Pflanzen bildeten nach $25, 6 \pm 2, 19$ Tagen die ersten Infloreszenzen. Bei gefluteten Pflanzen der Linien *cpk22*, *cpk23*, *athsp26.3-mito* und *athsp22-mito* war das nach $21, 2 \pm 1, 1$, nach $18, 4 \pm 0, 89$, nach $16, 8 \pm 1, 1$ und nach $22, 4 \pm 1, 67$ Tagen der Fall. Die gefluteten Pflanzen der Linie *atslp-mito* bildeten $39, 6 \pm 1, 67$ Tage nach Überflutung die ersten Infloreszenzen. Somit gingen Pflanzen der Linien *cpk22* und *athsp26.3-mito* insgesamt signifikant früher als der Wildtyp in die reproduktive Wachstumsphase über. Bei den Pflanzen der Linien *cpk23* und *athsp22-mito* war dies nur nach Überflutung der Fall. Pflanzen der Linie *atslp-mito* bildeten in Kontrolle und Test signifikant später als der Wildtyp Infloreszenzen aus. Des Weiteren wurde die durchschnittliche Anzahl an Rosetten- und Hochblättern pro Pflanze beim Übergang zur Blütenbildung bestimmt. Wildtyp-Pflanzen wiesen in der Kontrolle $9 \pm 0, 7$ Rosettenblätter pro Pflanze auf (siehe Abbildungen 3.26 und 3.27). Pflanzen der Linien *athsp26.3-mito*, *athsp22-mito* und *atslp-mito* besaßen zu diesem Zeitpunkt $7 \pm 0, 71$, $5 \pm 0, 71$ und $7 \pm 0, 71$ Rosettenblätter, was signifikant weniger als beim Wildtyp war. Bei Pflanzen der Linien *cpk22* und *cpk23* gab es keine Unterschiede zum Wildtyp.

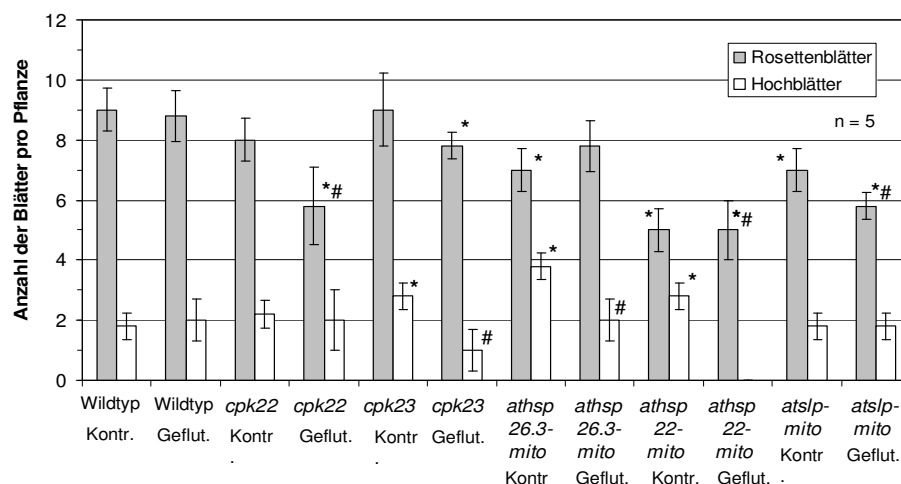


Abbildung 3.26: Anzahl an Rosetten- und Hochblättern beim Übergang zur Blütenbildung.

n: Anzahl der untersuchten Pflanzen pro Linie und Bedingung. Mit * markierte Daten waren nach Durchführung eines t-Tests signifikant unterschiedlich zum Wildtyp. Mit # markierte Daten waren signifikant unterschiedlich zur Kontrolle.

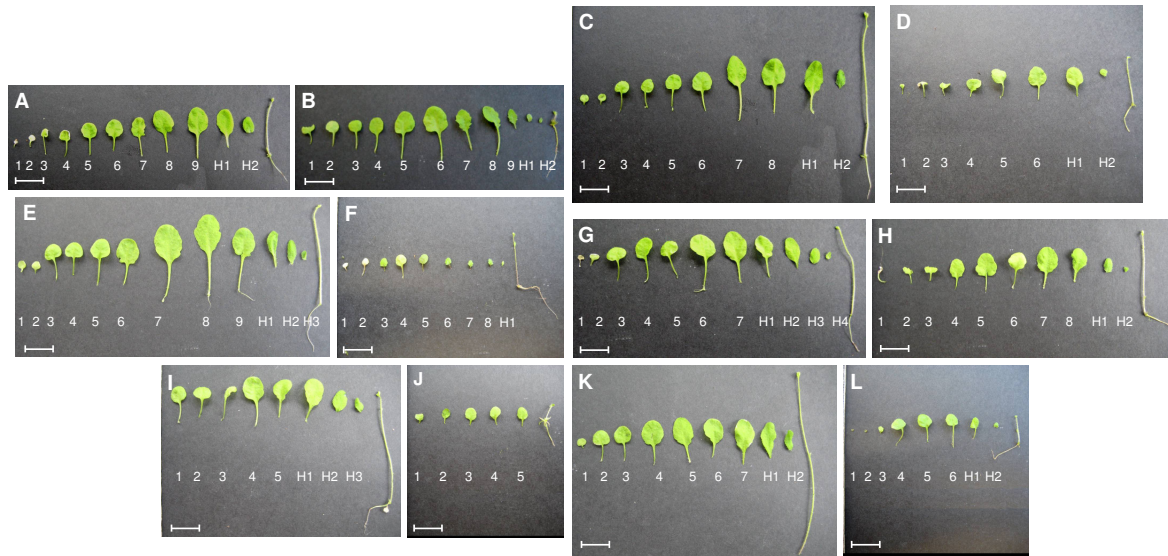


Abbildung 3.27: Exemplarische Darstellung von Pflanzen beim Übergang zur Blütenbildung.

A, C, E, G, I, K: Kontrolle; B, D, F, H, J, L: Geflutete Pflanzen. A, B: Wildtyp; C, D: *cpk22*; E, F: *cpk23*; G, H: *athsp26.3-mito*; I, J: *athsp22-mito*; K, L: *atslp-mito*. Die Blätter der Rosette sind der Reihenfolge ihres Auftretens gemäß numeriert. Hochblätter sind mit dem Buchstaben „H“ bezeichnet. Links zu sehen ist der Haupttrieb mit Wurzel, Sproß, primärer Infloreszenz und Knospe. Die Balken entsprechen 1 cm.

Geflutete Wildtyp-Pflanzen besaßen $8, 8 \pm 0, 84$ Rosettenblätter und zeigten keinen Unterschied zur Kontrolle. Die Linien *cpk22* und *atslp-mito* wiesen unter diesen Bedingungen $5, 8 \pm 1, 3$ und $5, 7 \pm 0, 45$ Rosettenblätter auf. Ihre Anzahl war somit geringer als die des Wildtyps und der Kontrolle. Geflutete Pflanzen der Linien *cpk23*, *athsp26.3-mito* und *athsp22-mito* unterschieden sich nicht von der Kontrolle. Signifikant weniger Rosettenblätter als der Wildtyp besaßen geflutete Pflanzen der Linien *cpk22*, *cpk23*, *athsp22-mito* und *atslp-mito*. Bei Pflanzen der Linie *athsp26.3-mito* wurde kein Unterschied zum Wildtyp beobachtet. Wildtyp-Pflanzen der Kontrolle besaßen beim Übergang zur Blütenbildung durchschnittlich $1, 8 \pm 0, 45$ Hochblätter. Pflanzen der Linien *cpk23*, *athsp26.3-mito* und *athsp22-mito* wiesen mit $2, 8 \pm 0, 45$, $3, 8 \pm 0, 45$ und $2, 8 \pm 0, 45$ Hochblättern pro Pflanze signifikant mehr als der Wildtyp auf. Geflutete Wildtyp-Pflanzen zeigten $2 \pm 0, 71$ Hochblätter und unterschieden sich nicht von der Kontrolle. Geflutete Pflanzen der Linien *cpk23* und *athsp26.3-mito* besaßen $1 \pm 0, 71$ und $2 \pm 0, 71$ Hochblätter und somit weniger als die Kontrolle. Geflutete Pflanzen der Linie *athsp22-mito* hatten keine Hochblätter gebildet. Bei Pflanzen der Linien *cpk22* und *atslp-mito* wurden keine Unterschiede zum Wildtyp und zur Kontrolle beobachtet. Mit Ausnahme von Wildtyp-Pflanzen und Pflanzen der Linie *athsp26.3-mito* wurde bei gefluteten Pflanzen eine reduzierte Blattgröße beobachtet (siehe Abbildung 3.27). T-DNA-Insertionsmutanten der Kontrolle wiesen beim Übergang zur Blütenbildung eine gegenüber

dem Wildtyp und gegenüber den korrespondierenden gefluteten Pflanzen verlängerte primäre Infloreszenz auf. Die durch Überflutung verursachte Hypoxie verzögerte somit bei allen Linien die Bildung der primären Infloreszenz und besaß negative Auswirkungen auf die Größe der Blätter sowie die Länge der Infloreszenz. Unterschiede in der Anzahl an Rosetten- und Hochblättern sowie der genaue Zeitpunkt des Auftretens der ersten Knospe waren von der jeweiligen Linie abhängig.

3.6.3.4 Größe und Morphologie ausgewachsener Pflanzen

Die Größe der Pflanzen wurde anhand der Länge des Haupttriebs bestimmt. Vermessen wurden pro Linie und Bedingung jeweils fünf Pflanzen. Verglichen mit der Kontrolle waren geflutete Pflanzen bei beginnender Samenreife im Alter von 50 Tagen zwergwüchsig (siehe Abbildungen 3.28 und 3.29). Ihre Blätter waren deutlich kleiner als die korrespondierenden Pflanzen des Kontrollversuchs. Auffällig waren bei allen gefluteten Pflanzen die dünnen Stengel, die teilweise unter dem Gewicht der Blüten und Schoten abknickten. Bei den Linien *cpk22*, *cpk23*, *athsp26.3-mito* und *athsp22-mito* wurden epinastische Seitentriebe beobachtet (siehe Abbildung 3.28). Nach 50 Tagen besaßen Wildtyp-Pflanzen der Kontrolle eine durchschnittliche Größe von $13,28 \pm 1,25$ cm, während geflutete Wildtyp-Pflanzen $4,76 \pm 1,12$ cm groß waren (siehe Abbildung 3.29).

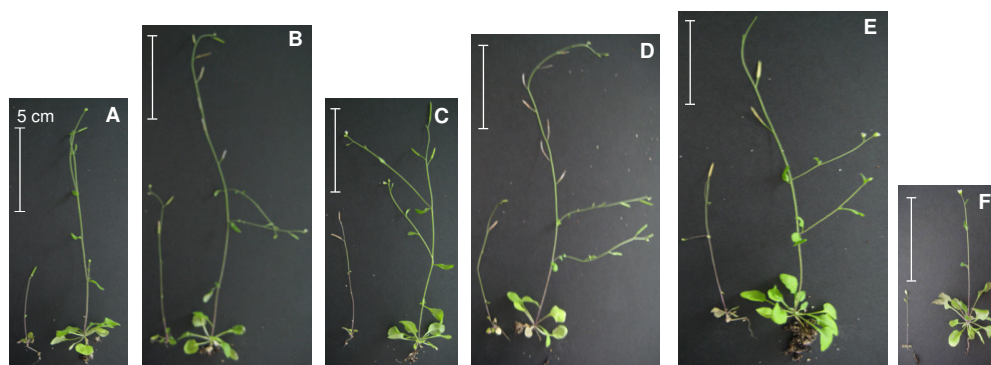


Abbildung 3.28: Exemplarisches Darstellung von Pflanzen bei beginnender Samenreife im Alter von 50 Tagen.

A: Wildtyp, B: *cpk22*, C: *cpk23*, D: *athsp26.3-mito*, E: *athsp22-mito*, F: *atslp-mito*. Links ist jeweils die geflutete Pflanze zu sehen, rechts die Kontrolle. Die Balken entsprechen 5 cm.

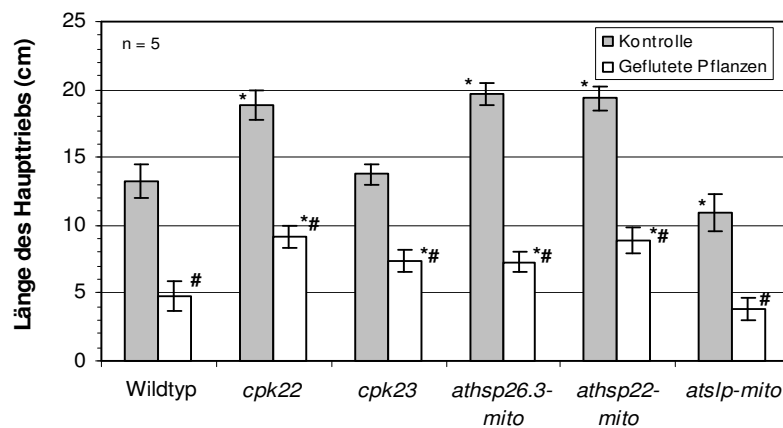


Abbildung 3.29: Größe von 50 Tage alten Pflanzen.

n: Anzahl der pro Linie und Bedingung untersuchten Pflanzen. Zur Bestimmung der Größe wurde die Länge des Haupttriebs von der Rosette bis zur Spitze der Pflanze gemessen. Mit * markierte Daten zeigten nach Durchführung eines t-Tests einen signifikanten Unterschied zum Wildtyp. Mit # markierte Daten waren signifikant unterschiedlich zur Kontrolle.

Pflanzen der Linien *cpk22*, *athsp26.3-mito* und *athsp22-mito* zeigten in der Kontrolle eine Länge von 18, 84 ± 1, 15 cm, 19, 72 ± 0, 80 cm sowie 19, 34 ± 0, 92 cm. Geflutete Pflanzen dieser Linien wiesen eine Länge von 9, 12 ± 0, 84 cm, 7, 26 ± 0, 74 cm und 8, 9 ± 0, 96 cm auf. Pflanzen dieser Linien waren somit in der Kontrolle als auch nach Überflutung größer als der Wildtyp. Pflanzen der Linie *atslp-mito* unterschieden sich nicht von Wildtyp-Pflanzen. Pflanzen der Linie *cpk23* unterschieden sich in der Kontrolle nicht vom Wildtyp, während die geflutete Pflanzen einen signifikant längeren Haupttrieb besaßen (7, 34 ± 0, 80 cm).

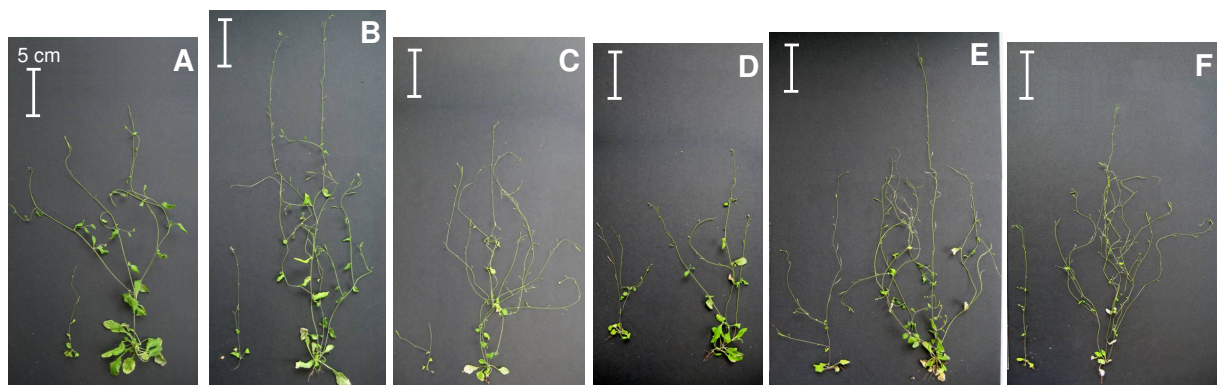


Abbildung 3.30: Exemplarische Darstellung von Pflanzen bei Versuchsende nach 70 Tagen.

A: Wildtyp, B: *cpk22*, C: *cpk23*, D: *athsp26.3-mito*, E: *athsp22-mito*, F: *atslp-mito*. Links ist jeweils die geflutete Pflanze zu sehen, rechts die Kontrolle. Die Balken entsprechen 5 cm.

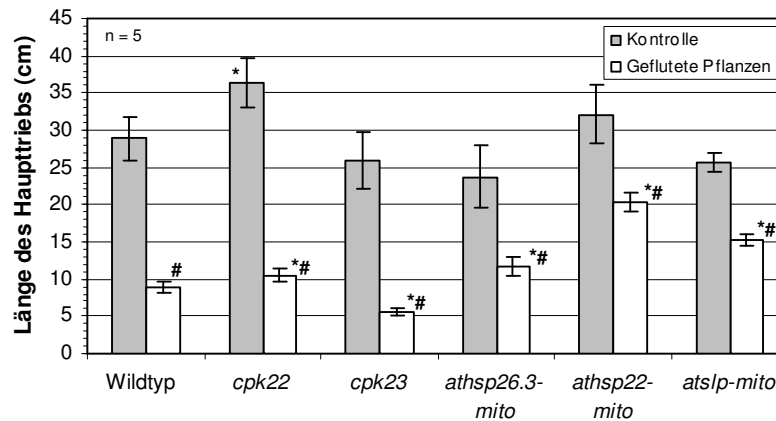


Abbildung 3.31: Größe von 70 Tage alten Pflanzen bei Versuchsende.

n: Anzahl der pro Linie und Bedingung untersuchten Pflanzen. Zur Bestimmung der Größe wurde die Länge des Haupttriebs von der Rosette bis zur Spitze der Pflanze gemessen. Pro Linie und Bedingung wurden fünf Pflanzen untersucht. Mit * markierte Daten zeigten nach Durchführung eines t-Tests einen signifikanten Unterschied zum Wildtyp. Mit # markierte Daten waren signifikant unterschiedlich zur Kontrolle.

Bei Versuchsende nach 70 Tagen war die Größe gefluteter Pflanzen gegenüber der Kontrolle immer noch reduziert (siehe Abbildungen 3.30 und 3.31). Wildtyp-Pflanzen der Kontrolle besaßen eine Länge von $28,9 \pm 2,89$ cm. Pflanzen der Linie *cpk22* wiesen in der Kontrolle eine Länge $36,44 \pm 3,31$ cm auf und waren somit signifikant größer als der Wildtyp. Bei Pflanzen der übrigen Linien wurde kein Unterschied festgestellt. Pflanzen der Linien *cpk23*, *athsp22-mito* und *atslp-mito* wiesen in der Kontrolle zudem stärkere Anzeichen von Seneszenz auf als Wildtyp-Pflanzen und Pflanzen der Linien *cpk22* und *athsp26.3-mito*. T-DNA-Insertionsmutanten der Kontrolle hatten weiterhin zwei bis drei zusätzliche Haupttriebe gebildet, während Wildtyp-Pflanzen nur einen Haupttrieb aufwiesen (siehe Abbildung 3.31). Bei den gefluteten Pflanzen wurde dies nicht beobachtet. Geflutete Pflanzen der Linie *cpk23* zeigten eine Länge von $5,6 \pm 0,53$ cm und waren somit signifikant kleiner als die $8,9 \pm 0,83$ cm langen Wildtyp-Pflanzen. Die übrigen gefluteten T-DNA-Insertionsmutanten waren signifikant größer als die Wildtyp-Pflanzen.

Insgesamt gesehen waren die gefluteten Pflanzen aller Linien zu beiden Zeitpunkten signifikant kleiner als die korrespondierenden Pflanzen der Kontrolle. Somit führte der Sauerstoffmangel bei allen Pflanzen zu einem reduzierten Längenwachstum. Die Unterschiede der T-DNA-Insertionsmutanten im Verhältnis zum Wildtyp waren von der jeweiligen Linie abhängig.

3.6.3.5 Anzahl an sekundären Infloreszenzen

Im Alter von 50 Tagen hatten Wildtyp-Pflanzen in der Kontrolle $2 \pm 0,71$ sekundäre Infloreszenzen gebildet (siehe Abbildung 3.32). Pflanzen der Linie *atslp-mito* besaßen $0,4 \pm 0,52$ Seitentriebe und somit signifikant weniger als der Wildtyp. Die übrigen T-DNA-Insertionsmutanten wiesen keine Unterschiede auf. Geflutete Wildtyp-Pflanzen und Pflanzen der Linie *cpk23* besaßen mit $0,2 \pm 0,43$ und $0,4 \pm 0,53$ sekundären Infloreszenzen signifikant weniger Seitentriebe als die Kontrolle. Bei den übrigen Linien wurden zwischen den gefluteten Pflanzen und der Kontrolle keine Unterschiede beobachtet. Im Vergleich mit dem Wildtyp traten bei gefluteten Pflanzen der Linie *athsp22-mito* mehr sekundäre Infloreszenzen ($0,8 \pm 0,82$) auf. Geflutete Pflanzen der übrigen Linien zeigten keine Unterschiede.

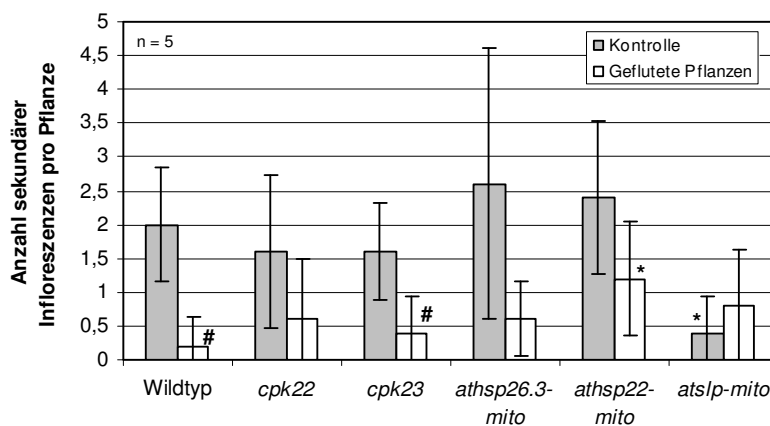


Abbildung 3.32: Anzahl sekundärer Infloreszenzen bei 50 Tage alten Pflanzen.

n: Anzahl der pro Linie und Bedingung untersuchten Pflanzen. Mit * markierte Daten zeigten nach Durchführung eines t-Tests einen signifikanten Unterschied zum Wildtyp. Mit # markierte Daten waren signifikant unterschiedlich zur Kontrolle.

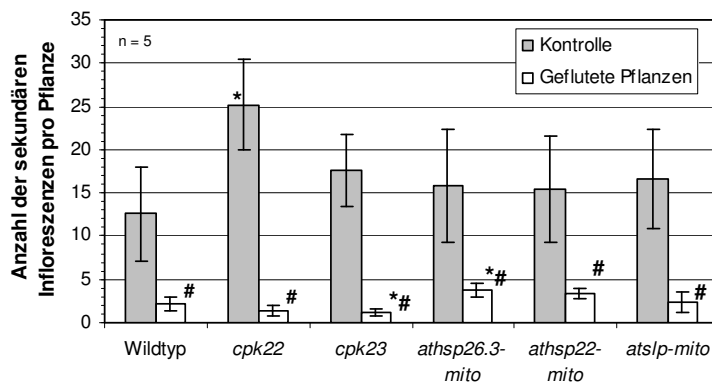


Abbildung 3.33: Anzahl sekundärer Infloreszenzen bei 70 Tage alten Pflanzen.

n: Anzahl der pro Linie und Bedingung untersuchten Pflanzen. Mit * markierte Daten zeigten nach Durchführung eines t-Tests einen signifikanten Unterschied zum Wildtyp. Mit # markierte Daten waren signifikant unterschiedlich zur Kontrolle.

Bei Versuchsende nach 70 Tagen wies die Kontrolle signifikant mehr Infloreszenzen auf als die gefluteten Pflanzen (siehe Abbildung 3.33). Wildtyp-Pflanzen der Kontrolle besaßen durchschnittlich $12,6 \pm 5,46$ sekundäre Infloreszenzen pro Pflanze. Unterschiede zu den T-DNA-Insertionsmutanten wurden in der Kontrolle mit Ausnahme von Pflanzen der Linie *cpk22* nicht beobachtet. Diese wiesen mit $17,6 \pm 4,23$ sekundären Infloreszenzen signifikant mehr Seitentriebe als der Wildtyp auf. Geflutete Wildtyp-Pflanzen zeigten $2,2 \pm 0,84$ sekundäre Infloreszenzen. Die gefluteten Pflanzen der Linie *cpk23* wiesen weniger ($1,2 \pm 0,45$), die der Linie *athsp26.3-mito* dagegen mehr Seitentriebe ($3,8 \pm 0,84$) als der Wildtyp auf. Bei den übrigen Linien traten keine Unterschiede auf. Somit besaßen alle Pflanzen der Kontrolle nach 70 Tagen signifikant mehr sekundäre Infloreszenzen als die gefluteten Pflanzen, während dies bei 50 Tage alten Pflanzen nur beim Wildtyp und bei der Linie *cpk23* beobachtet wurde. Die Ausbildung von Seitentrieben wurde somit durch Hypoxie signifikant reduziert. Die jeweilige Anzahl an sekundären Infloreszenzen sowie der Zeitpunkt ihrer Ausbildung war bei den T-DNA-Insertionsmutanten linienspezifisch.

3.6.3.6 Morphologie der Blüten

Zur Untersuchung von blütenspezifischen Merkmalen wurden Blüten im Stadium 13 (Smyth et al., 1990) zu Beginn der Anthese verwendet. Pro Linie und Bedingung wurden fünf Pflanzen analysiert.

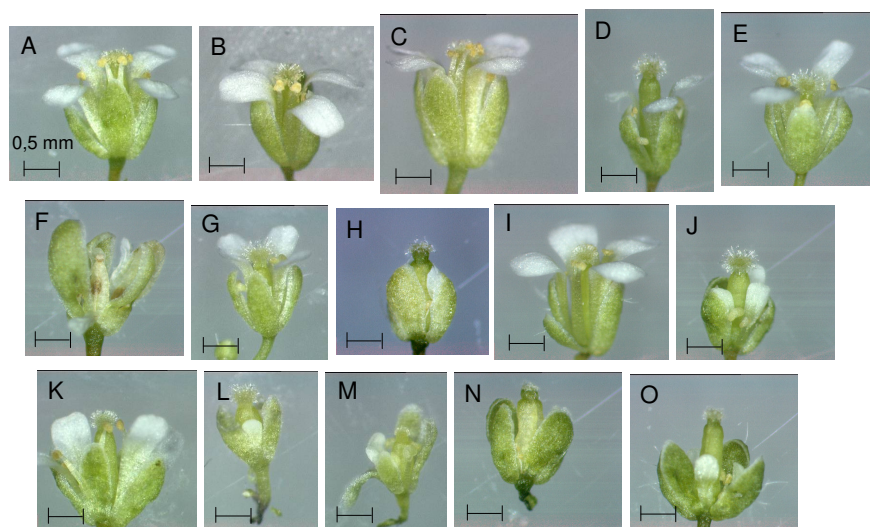


Abbildung 3.34: Exemplarische Darstellung von Blüten der Linien *cpk22*, *cpk23* und *atslp-mito*.

A, C, D, G, H, K, L, M: Kontrolle. B, E, F, I, J, N, O: Geflutet. A, B: Wildtyp; C, D, E, F: *cpk22*; G, H, I, J: *cpk23*; K, L, M, N, O, P: *atslp-mito*. Untersucht wurden Blüten im Stadium 13 (Smyth et al., 1990). Die Balken entsprechen 0,5 mm.

Blüten der Linien *athsp26.3-mito* und *athsp22-mito* unterschieden sich nicht vom Wildtyp (Daten nicht gezeigt). Jede Pflanze der Linien *cpk22* und *cpk23* besaß etwa zur Hälfte normal ausgebildete Blüten (siehe Abbildung 3.34). Die übrigen Blüten wiesen unterschiedlich große Sepalen pro Blüte sowie verkleinerte Petalen auf. Die Filamente der Stamen waren ebenfalls verkürzt. Dies wurde bei gefluteten Pflanzen und in der Kontrolle beobachtet. Bei Pflanzen der Linie *atslp-mito* zeigte etwa ein Drittel der Blüten pro Pflanze in der Kontrolle keinen Unterschied zum Wildtyp. Die übrigen zwei Drittel der Blüten waren geringfügig kleiner als Wildtyp-Blüten und besaßen verkürzte Petale. Außerdem wurden verkürzte Filamente oder vollständig fehlende Stamen beobachtet. Geflutete Pflanzen der Linie *atslp-mito* besaßen keine normal ausgebildeten Blüten. Die Blüten wiesen neben der geringeren Größe alle verkürzte Petale, Filamente und zum Teil fehlgebildete Antheren auf.

3.6.3.7 Vitalitätstest des Pollens

Der Vitalitätstest für Pollen wurde mit der Färbetechnik nach Alexander (1969) durchgeführt (siehe Abbildung 3.35). Bei dieser Methode wird das Cytoplasma rot und das Sporoderm grün angefärbt. Vitale Pollen weisen daher eine rote Färbung auf, während beschädigte oder unvollständig ausgebildete Pollenkörner grün erscheinen. Es wurden drei Versuche durchgeführt, bei denen jeweils 100 Pollenkörner pro Linie und Bedingung untersucht wurden.

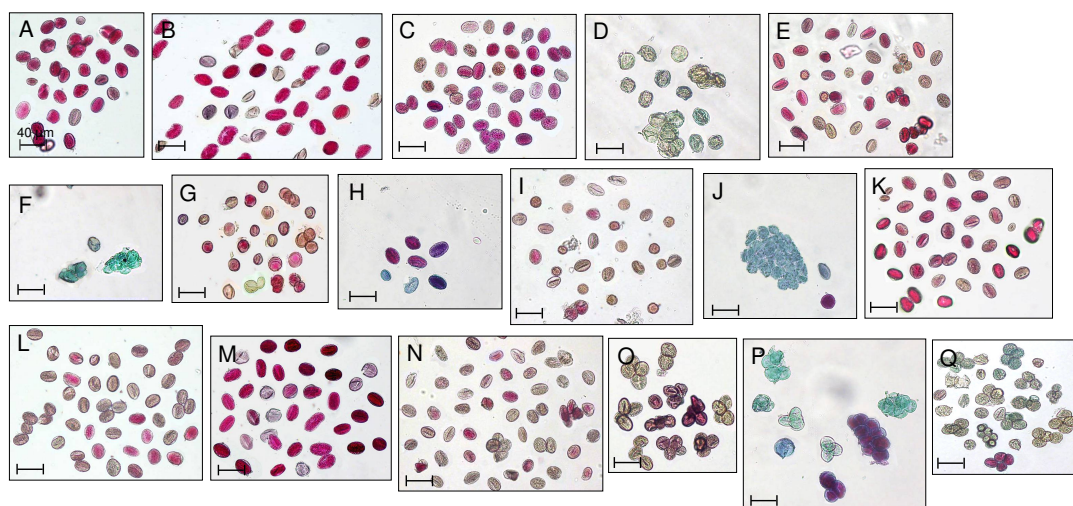


Abbildung 3.35: Alexanderfärbung zur Überprüfung der Pollenvitalität.

A, C, D, G, H, K, M, O, P: Kontrolle. B, E, F, I, J, L, N, Q: Geflutete Pflanzen. A, B: Wildtyp; C, E: *cpk22* normale Blüten; D, F: *cpk22* deformierte Blüten; G, I: *cpk23* normale Blüten; H, J: *cpk23* deformierte Blüten; K, L: *athsp26.3-mito*; M, N: *athsp22-mito*; O: *atslp-mito* normale Blüten; P, Q: *atslp-mito* deformierte Blüten. Das Cytoplasma ist rot, das Sporoderm grün gefärbt. Vitaler Pollen erscheint rot, unfruchtbarer Pollen grün. Die zur Präparation verwendeten Blüten stammten pro Linie und Bedingung von fünf verschiedenen Pflanzen und befanden sich in den Stadien 13 bis 15 (Smyth et al., 1990). Die Balken entsprechen 40 µm.

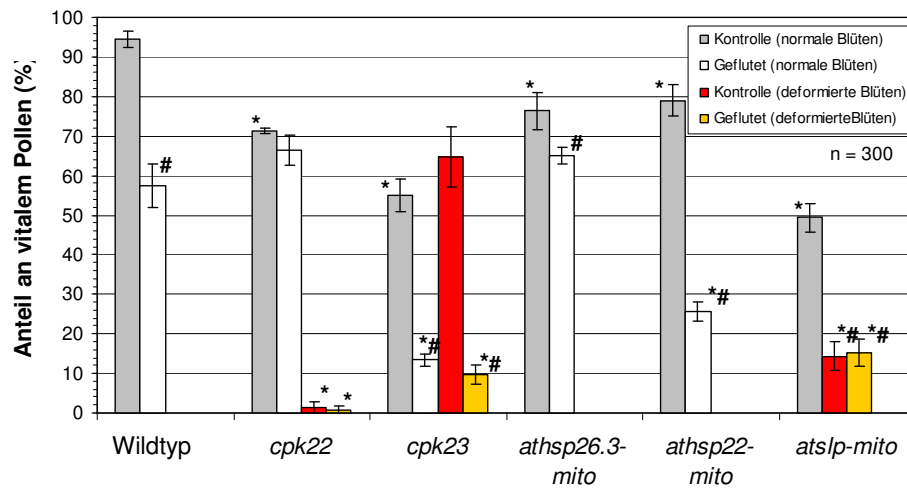


Abbildung 3.36: Vergleich des prozentualen Anteils an vitalem Pollen

n: Anzahl der pro Linie und Bedingung untersuchten Pflanzen. Die Blüten befanden sich in den Stadien 13 bis 15 (Smyth et al., 1990). Mit * markierte Daten zeigten nach Durchführung eines t-Tests einen signifikanten Unterschied zum Wildtyp. Mit # markierte Daten waren signifikant unterschiedlich zur Kontrolle.

Die Blüten stammten pro Linie und Bedingung von fünf verschiedenen Pflanzen. Bei Pflanzen der Linien *cpk22*, *cpk23* und *atslp-mito* wurden dem Wildtyp entsprechende Blüten und deformierte Blüten getrennt untersucht. Bei gefluteten Pflanzen der Linie *atslp-mito* wurden nur deformierte Blüten analysiert, da keine normalen Blüten gebildet wurden. Alle Blüten befanden sich zum Zeitpunkt der Untersuchung in den Stadien 13 bis 15 (Smyth et al., 1990). Die Pollenvitalität war bei gefluteten Pflanzen geringer als in der Kontrolle (siehe Abbildung 3.36). Eine Ausnahme stellten Pflanzen der Linie *cpk22* dar, die keinen Unterschied aufwiesen. Verglichen mit dem Wildtyp (94, 33% \pm 2, 08% vitaler Pollen) wiesen die T-DNA-Insertionsmutanten der Linien *cpk22*, *cpk23*, *athsp26.3-mito*, *athsp22-mito* und *atslp-mito* in der Kontrolle eine geringere Pollenvitalität auf (71, 33% \pm 0, 58%; 55% \pm 4%; 76, 33% \pm 4, 73%; 79% \pm 4%; 49, 33% \pm 3, 51%). Geflutete Wildtyp-Pflanzen besaßen zu 55, 33% \pm 5, 51% vitalen Pollen. Geflutete Pflanzen der Linien *cpk23*, *athsp22-mito* und *atslp-mito* wiesen zu 13, 33% \pm 1, 53%, zu 25, 66% \pm 2, 52% und zu 14, 33% \pm 3, 51% vitalen Pollen auf. Ihre Pollenvitalität war somit gegenüber dem Wildtyp reduziert. Geflutete Pflanzen der Linien *cpk22* und *athsp26.3-mito* zeigten diesbezüglich keinen Unterschied. Deformierte Blüten der Linie *cpk22* wiesen sowohl in der Kontrolle (1, 33% \pm 1, 53%) als auch nach Überflutung (0, 67% \pm 1, 15%) weniger vitalen Pollen auf als normal ausgebildete Blüten dieser Linie (71, 33% \pm 0, 58%; 66, 33% \pm 3, 79%). Bei deformierten Blüten der Linien *cpk23* und *atslp-mito* wurde kein Unterschied beobachtet. Somit beeinflusste Hypoxie die Pollenvitalität bei Wildtyp-Pflanzen sowie bei Pflanzen der Linien *cpk23*, *athsp22-mito* und *atslp-mito*. Die Unterschiede zwischen T-DNA-Insertionsmutanten und Wildtyp waren linienspezifisch.

3.6.3.8 Untersuchung der Samenanlagen

Die Samenanlagen aller Pflanzen waren normal ausgebildet. Bei gefluteten Pflanzen sowie Pflanzen der Kontrolle wurde kein Unterschied zum Wildtyp beobachtet (Daten nicht gezeigt).

3.6.3.9 Auftreten der ersten Schoten

Als Schoten wurden Blüten in den Stadien 16 und 17 definiert (Smyth et al, 1990). In diesen Stadien verwelkten die Petalen und Sepalen bereits und die Blütenorgane begannen, von den grünen Schoten abzufallen. Das Auftreten der ersten Schoten wurde pro Linie und Bedingung bei fünf Pflanzen untersucht. Bei Wildtyp-Pflanzen der Kontrolle wurden die ersten Schoten $23,6 \pm 0,89$ Tage nach Durchführung der Überflutungsversuche beobachtet (siehe Abbildung 3.37). Pflanzen der Linien *cpk22* und *athsp-26.3-mito* bildeten nach $18,8 \pm 1,1$ und nach $19,2 \pm 1,1$ Tagen signifikant früher als der Wildtyp die ersten Schoten. Pflanzen der Linie *athsp22-mito* bildeten in der Kontrolle zeitgleich mit dem Wildtyp die ersten Schoten, während Pflanzen der Linien *cpk23* und *atslp-mito* mit $25,6 \pm 0,89$ und $37,2 \pm 3,03$ Tagen später als der Wildtyp Schoten bildeten. Geflutete Wildtyp-Pflanzen und Pflanzen der Linien *cpk22*, *athsp26.3-mito* und *atslp-mito* bildeten mit $30,4 \pm 2,19$, $27,6 \pm 0,89$, $27,6 \pm 0,89$ und $50,4 \pm 2,61$ Tagen später Schoten als die Kontrolle. Geflutete Pflanzen der Linien *cpk23* und *athsp22-mito* unterschieden sich nicht von der Kontrolle.

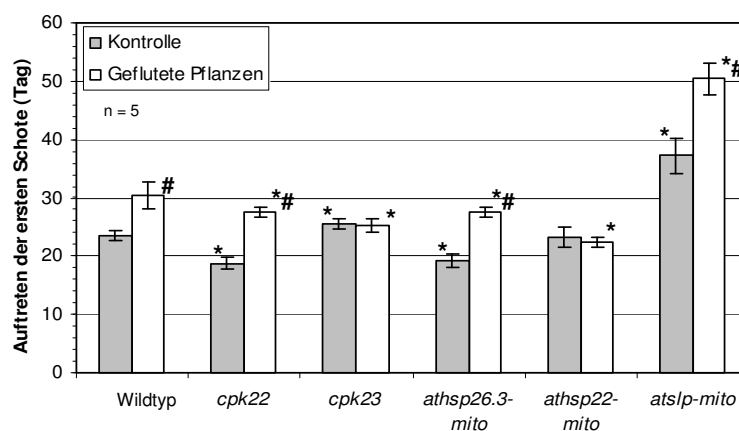


Abbildung 3.37: Auftritt der ersten Schote.

Gezählt wurden die Tage ab Ende der Überflutung. n: Anzahl der pro Linie und Bedingung untersuchten Pflanzen. Mit * markierte Daten zeigten nach Durchführung eines t-Tests einen signifikanten Unterschied zum Wildtyp. Mit # markierte Daten waren signifikant unterschiedlich zur Kontrolle.

Bei gefluteten Pflanzen der Linien *cpk22* und *athsp-26.3-mito* wurden die ersten Schoten nach $27, 6 \pm 0, 89$ Tagen beobachtet. Verglichen mit dem Wildtyp traten die ersten Schoten somit bei diesen Linien in der Kontrolle und nach Überflutung früher auf. Geflutete Pflanzen der Linien *cpk23* und *athsp22-mito* bildeten nach $25, 2 \pm 1, 1$ und $2, 4 \pm 0, 89$ Tagen signifikant früher als der Wildtyp die ersten Schoten. Pflanzen der Linie *atslp-mito* bildeten unter beiden Bedingungen signifikant später als der Wildtyp die ersten Schoten. Somit wurde der Zeitpunkt der Schotenbildung bei Pflanzen der Linien *cpk22*, *athsp26.3-mito* und *atslp-mito* durch Hypoxie beeinflusst. Auf Pflanzen der Linien *cpk23* und *athsp22-mito* hatte der Sauerstoffmangel bezüglich dieses Merkmals keine Auswirkung. Der genaue Zeitpunkt des Auftretens der ersten Schote war sowohl in der Kontrolle als auch nach Überflutung linienspezifisch.

3.6.3.10 Anzahl der Schoten bei beginnender Samenreife und bei Versuchsende

Bei beginnender Samenreife im Alter von 50 Tagen wurde die Anzahl der Schoten bestimmt. Als Schoten wurden Blüten in den Stadien 16 bis 19 (Smyth et al., 1990) definiert. Pro Linie und Bedingung wurden fünf Pflanzen untersucht. Wildtyp-Pflanzen der Kontrolle besaßen zu diesem Zeitpunkt $1, 2 \pm 0, 2$ Schoten (siehe Abbildung 3.38). Pflanzen der Linien *cpk22*, *cpk23*, *athsp26.3-mito* und *athsp22-mito* hatten $7, 6 \pm 1, 14$, $5 \pm 0, 71$, 13 ± 2 und $3, 6 \pm 1, 14$ Schoten und damit signifikant mehr als der Wildtyp gebildet. Geflutete Pflanzen der Linien *cpk22*, *cpk23*, *athsp26.3-mito* und *athsp22-mito* besaßen $1, 6 \pm 0, 55$, $1, 2 \pm 0, 84$, $1, 8 \pm 0, 45$ und $1, 2 \pm 0, 45$ Schoten pro Pflanze.

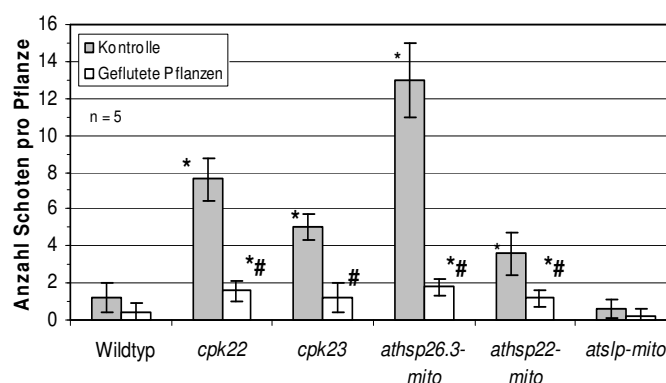


Abbildung 3.38: Anzahl der Schoten bei 50 Tage alten Pflanzen.

Als Schoten wurden Blüten in den Stadien 16 bis 19 definiert (Smyth et al., 1990). n: Anzahl der pro Linie und Bedingung untersuchten Pflanzen. Mit * markierte Daten zeigten nach Durchführung eines t-Tests einen signifikanten Unterschied zum Wildtyp. Mit # markierte Daten waren signifikant unterschiedlich zur Kontrolle.

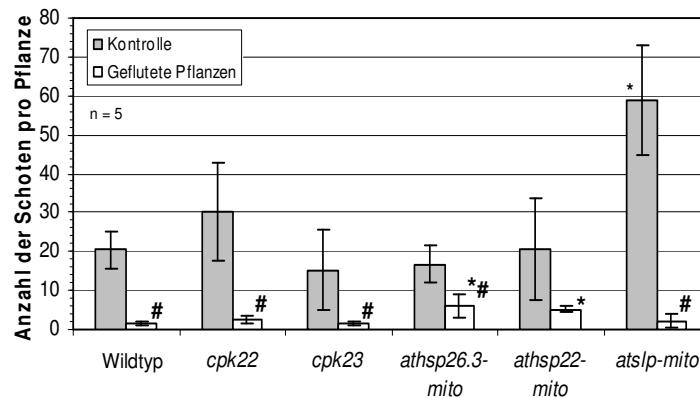


Abbildung 3.39: Anzahl der Schoten bei 70 Tage alten Pflanzen.

Als Schoten wurden Blüten in den Stadien 16 bis 19 nach Smyth et al., 1990, definiert. n: Anzahl der pro Linie und Bedingung untersuchten Pflanzen. Mit * markierte Daten zeigten nach Durchführung eines t-Tests einen signifikanten Unterschied zum Wildtyp. Mit # markierte Daten waren signifikant unterschiedlich zur Kontrolle.

Die Anzahl war somit geringer als in der Kontrolle, aber höher als bei gefluteten Wildtyp-Pflanzen, welche $0,4 \pm 0,55$ Schoten pro Pflanze aufwiesen. Bei gefluteten Wildtyp-Pflanzen und Pflanzen der Linie *atslp-mito* wurde kein Unterschied zur Kontrolle beobachtet. Pflanzen der Linie *atslp-mito* wiesen in der Kontrolle und nach Überflutung keinen Unterschied zum Wildtyp auf. Bei Versuchsende nach 70 Tagen besaßen alle gefluteten Pflanzen signifikant weniger Schoten als die Kontrolle (siehe Abbildung 3.39). Eine Ausnahme stellten Pflanzen der Linie *athsp22-mito* dar, die keinen Unterschied zur Kontrolle zeigten. In der Kontrolle wurde nur bei der Linie *atslp-mito* eine signifikant höhere Schotenanzahl ($58,8 \pm 14,13$) im Vergleich zum Wildtyp ($20,4 \pm 4,83$) beobachtet. Bei den gefluteten Pflanzen wiesen die Linien *athsp26.3-mito* und *athsp22-mito* signifikant mehr Schoten ($6 \pm 2,92$ und $5,2 \pm 0,84$) als der Wildtyp ($1,6 \pm 0,55$) auf. Somit besaßen Wildtyp-Pflanzen und Pflanzen der Linien *cpk22*, *athsp22-mito* und *atslp-mito* in der Kontrolle bei Versuchsende mehr Schoten als bei beginnender Samenreife. Von den gefluteten Pflanzen wiesen die Linien *athsp26.3-mito* und *athsp22-mito* bei Versuchsende mehr Schoten auf als bei beginnender Samenreife. Geflutete Pflanzen der Linien *cpk22*, *cpk23* und *atslp-mito* bildeten im Alter von 50 bis 70 Tagen keine neuen Schoten. Somit reproduzierten sich Pflanzen der Linien *cpk22*, *cpk23*, *athsp26.3-mito* und *athsp22-mito* in der Kontrolle schneller als der Wildtyp. Pflanzen der Linien *athsp26.3-mito* und *athsp22-mito* zeigten dieses Verhalten auch nach Überflutung. Pflanzen der Linie *atslp-mito* bildeten insgesamt später Schoten. Ihre Anzahl war in der Kontrolle bei Versuchsende deutlich höher als bei Pflanzen der übrigen Linien. Bei gefluteten Pflanzen der Linie *atslp-mito* wurde dies nicht beobachtet. Damit reduzierte Hypoxie die Schotenanzahl aller untersuchten Pflanzen. Die Anzahl der Schoten sowie der Zeitpunkt ihres Auftretens waren linienspezifisch.

3.6.3.11 Morphologie der Schoten und Samen

Untersucht wurden Schoten in den Stadien 18 und 19 (Smyth et al., 1990). Pro Linie und Bedingung wurden 20 Schoten analysiert. Schoten gefluteter Wildtyp-Pflanzen waren durchschnittlich 0,2 mm kürzer als die Kontrolle. Geflutete Pflanzen der übrigen Linien unterschieden sich nicht von der Kontrolle (siehe Abbildung 3.40). Schoten der T-DNA-Insertionsmutanten sowie gefluteter Wildtyp-Pflanzen wiesen vereinzelt fehlgebildete, vorzeitig abgestorbene Samen auf (siehe Abbildung 3.41). Des Weiteren waren viele Schoten von gefluteten Wildtyp-Pflanzen und T-DNA-Insertionsmutanten nicht vollständig mit Samen gefüllt, was auf unbefruchtete Samenanlagen hinweist.

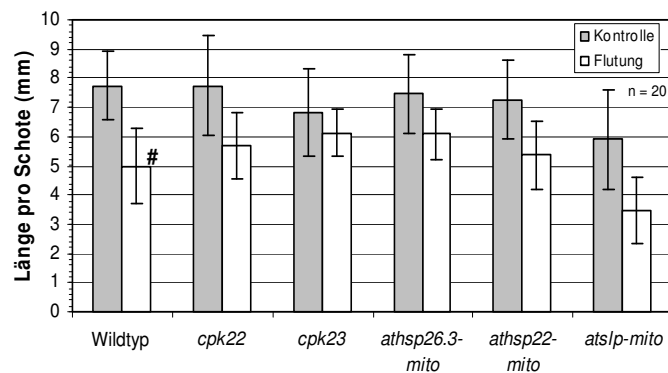


Abbildung 3.40: Vergleich der durchschnittlichen Schotenlänge.

n: Anzahl der pro Linie und Bedingung untersuchten Schoten. Mit # markierte Daten zeigten nach Durchführung eines t-Tests einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle.

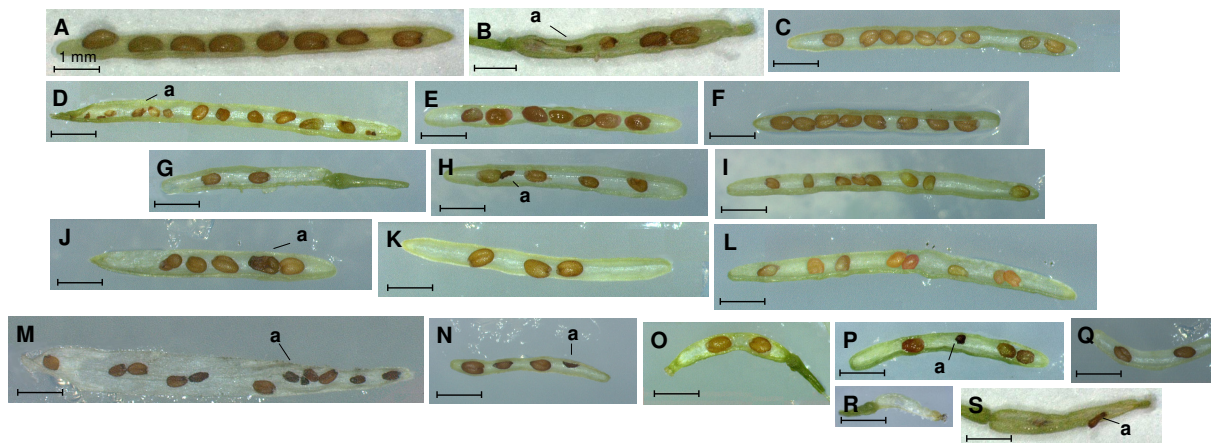


Abbildung 3.41: Exemplarische Abbildung von Schoten der einzelnen Linien.

A, C, D, F, G, I, L, M, P, Q, R: Kontrolle. B, E, H, J, K, N, O, S: Geflutete Pflanzen. A, B: Wildtyp; C, D, E: *cpk22*; F, G, H: *cpk23*; I, J, K: *atshp26.3-mito*; L, M, N, O: *athsp22-mito*; P, Q, R, S: *atslp-mito*. a: vorzeitig abgestorbene Samen. Untersucht wurden Schoten in den Stadien 18 und 19 (Smyth et al., 1990). Die Balken entsprechen 1 mm.

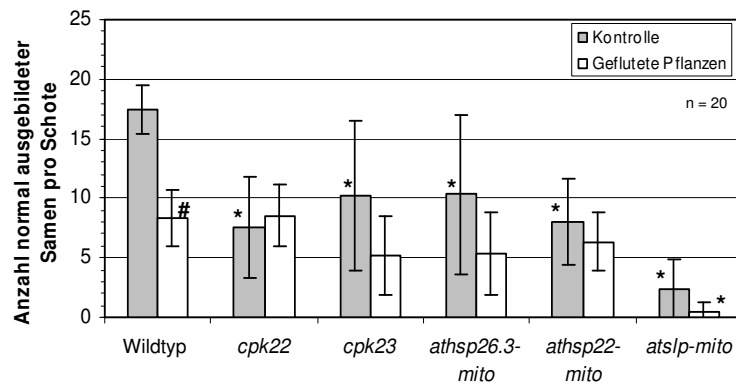


Abbildung 3.42: Anzahl normal ausgebildeter Samen pro Schote.

n: Anzahl der pro Linie und Bedingung untersuchten Schoten. Zur Analyse wurden Schoten in den Stadien 18 und 19 verwendet (Smyth et al., 1990). Mit * markierte Daten zeigten nach Durchführung eines t-Tests einen signifikanten Unterschied zum Wildtyp. Mit # markierte Daten waren signifikant unterschiedlich zur Kontrolle.

Die Größe der Samen unterschied sich nicht vom Wildtyp (Daten nicht gezeigt). Bei gefluteten Pflanzen traten diese Merkmale verstärkt auf. Besonders betroffen waren Pflanzen der Linie *atslp-mito*, bei denen viele Schoten gar keine Samen enthielten. Zur Bestimmung der Samenanzahl wurden je Linie und Bedingung 20 Schoten analysiert. Zur Untersuchung wurden Schoten in den Stadien 18 und 19 verwendet (Smyth et al., 1990). Die Anzahl an normal ausgebildeten Samen pro Schote war nur bei gefluteten Wildtyp-Pflanzen ($8,35 \pm 2,3$) im Vergleich zur Kontrolle ($17,45 \pm 2,1$) reduziert (siehe Abbildung 3.42). Die T-DNA-Insertionsmutanten zeigten diesbezüglich keine Unterschiede. In der Kontrolle besaßen alle T-DNA-Insertionsmutanten signifikant weniger normale Samen pro Schote als der Wildtyp. Bei den gefluteten Pflanzen besaß nur Linie *atslp-mito* weniger normale Samen ($0,5 \pm 0,67$) als Wildtyp-Pflanzen. Die übrigen T-DNA-Insertionsmutanten zeigten diesbezüglich keine Unterschiede. Somit beeinflusste Hypoxie die Anzahl an normal ausgebildeten Samen nur beim Wildtyp.

4 Diskussion

Der Prozess der Sauerstoffwahrnehmung bei Pflanzen wurde bislang in seinem Ablauf noch nicht vollständig aufgeklärt. Man geht von einer auf Veränderungen des Stoffwechsels basierenden indirekten Wahrnehmung aus (Bailey-Serres und Chang, 2005). Sauerstoff wird in der Zelle als finaler Elektronenakzeptor der mitochondrialen Atmungskette benötigt. Daher werden Schwankungen der zellulären Sauerstoffkonzentration möglicherweise zuerst in diesen Organellen wahrgenommen. Dort werden bei Hypoxie vermehrt reaktive Sauerstoffspezies (ROS) gebildet, da Sauerstoffmangel die beiden terminalen Oxidasen inhibiert (Szal et al., 2003; Igamberdiev et al. 2005; Rhoads et al., 2006). Die ROS fungieren möglicherweise zusammen mit Ca^{2+} -Ionen als Signalmoleküle für die hypoxische Stressantwort (Laloi et al., 2004; Rhoads und Subbaiah, 2007). Über die Weiterleitung von stressinduzierten mitochondrialen Signalen an den Zellkern ist nur wenig bekannt. Es wird davon ausgegangen, dass neben ROS und Ca^{2+} -Ionen auch kalziumabhängige Proteinkinasen, Calmoduline, calcineurin-B-artige Proteine, Transkriptionsfaktoren und noch unbekannte regulatorische Proteine an der mitochondrialen retrograden Signaltransduktion beteiligt sind. Über diese Faktoren wird eine Veränderung der Genexpression zwecks Adaption der Pflanze an die veränderten Umweltbedingungen ausgelöst (Sanders et al., 2002, Tuteja und Mahajan, 2007).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Sauerstoffverbrauch von *Arabidopsis thaliana*-Zellkulturen ermittelt sowie Veränderungen der mitochondrialen Struktur und Dynamik bei fortschreitendem Sauerstoffmangel *in vivo* untersucht. Durch quantitative Real Time PCR wurde eine Beeinflussung der Expression der nukleär kodierten Gene der mitochondrial lokalisierten Proteine ATHSP26.3-mito, ATHSP23.6-mito, ATHSP22-mito, PHL, AOX1a, CML38 und ATIDD14 durch Sauerstoffmangel gezeigt. Weiterhin wurden zwei möglicherweise an der mitochondrialen retrograden Regulierung beteiligte kalziumabhängigen Proteinkinasen identifiziert. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Bestimmung der subzellulären Lokalisation der Proteine ATHSP26.3-mito, ATHSP23.6-mito, ATHSP22-mito, PHL, ATIDD14, CML38 und CPK22 mittels GFP-Reportergenkonstrukten. Ebenfalls untersucht wurde die Zusammensetzung des mitochondrialen Proteoms von *A. thaliana* unter Hypoxieeinfluss. Um erste Hinweise auf eventuelle metabolische Funktionen der in diesen Experimenten identifizierten hypoxiebeeinflussten Proteine zu erhalten, wurden phänotypische Studien mit entsprechenden T-DNA-Insertionsmutanten durchgeführt.

4.1 Mögliches Auftreten von *Oxidative Bursts* bei *Arabidopsis thaliana*-Zellkulturen unter hypoxischen Bedingungen

Während der Messung des Sauerstoffverbrauchs von *Arabidopsis thaliana*-Zellkulturen unter hypoxischen Bedingungen trat alle dreieinhalb bis vier Stunden ein starker etwa 30minütiger Anstieg der O₂-Konzentration an (siehe 3.1.1). Anschließend fiel der Wert jedesmal wieder auf die Ausgangskonzentration ab. Etwa dreißig bis sechzig Minuten vor jedem Ausschlag wurde ein Abfall des Sauerstoffgehalts beobachtet. Da die Messungen reproduzierbar waren, können eventuelle Messfehler ausgeschlossen werden. Während der 14stündigen Messung fand keine Sauerstoffzufuhr von außen statt. Die Inkubation der Zellkulturen geschah unter Lichtausschluss, so dass eine Bildung von Sauerstoff durch Photosynthese ebenfalls ausgeschlossen werden konnte. Da die Zugabe von H₂O₂ unter normoxischen Bedingungen einen ähnlicher Effekt bewirkte (siehe 3.1.2), ist an dem Vorgang möglicherweise das Enzym Katalase beteiligt. Dieses disproportioniert H₂O₂ zu Wasser und Sauerstoff (Sánchez-Casas und Klessig, 1994). Eine fluorometrische Analyse der Katalaseaktivität von Zellkulturen unter Hypoxie war aufgrund des Versuchsaufbaus und der Zusammensetzung des Mediums nicht möglich. Ein direkter Nachweis wurde daher nicht erbracht. Ein Kontrollversuch mit reinem MSMO-Medium zeigte aber, dass die Dissoziation von H₂O₂ allein für eine Detektion durch die Messelektrode nicht ausreichte. Erst die Zugabe von Katalase führte zu einem Anstieg des Sauerstoffgehalts.

Unter hypoxischen Bedingungen werden durch die Unterbrechung der mitochondrialen Atmungskette verstärkt ROS gebildet (Rhoads et al., 2006). Daher könnten die Ausschläge der Messkurve möglicherweise durch Ausstöße von ROS aus den Zellen, sogenannten *Oxidative Bursts*, verursacht worden sein. Mitochondriale *Oxidative Bursts* entstehen unter anderem durch Inhibierung von Komplexen der Elektronentransportkette. Das dabei entstehende H₂O₂ veranlasst eine Öffnung von porenartigen Strukturen in der mitochondrialen Membran, durch die es das Organell verlassen kann und die zu einem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials führen (Yao et al., 2002; Yao et al., 2004; Tiwari et al., 2002). Diese Poren bestehen aus dem spannungsabhängigen Anionenkanal VDAC, dem Adeninnukleotidtransporter ANT und Cyclophilin D. Die Ausbildung dieser Poren führt zum Einstrom von Wasser und darin gelösten Substanzen in die mitochondriale Matrix (Tsujimoto et al., 2006). Dies führt zum Anschwellen und Platzen der Mitochondrien und zum Austritt von Proteinen wie zum Beispiel Cytochrom c in das Cytoplasma (Yoshinaga et al., 2005b). Durch die Ablösung von Cytochrom c von der inneren mitochondrialen Membran kommt es

zur Entkopplung von Atmung und ATP-Produktion, was einen ATP-Mangel zur Folge hat (Tiwari et al., 2002). Die Akkumulierung von H_2O_2 und Cytochrom c im Cytoplasma sowie der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials stellt ein Signal zur Initiierung des programmierten Zelltods dar (Yao et al., 2002; Yao et al., 2004; Tiwari et al., 2002). Eine weitere Quelle für H_2O_2 stellen in der Zellmembran lokalisierte NADPH-Oxidasen dar (Sagi und Fluhr, 2001). Diese Proteine besitzen cytosolische FAD- und NADPH-bindende Domänen, zwei Ca^{2+} -bindende EF-Hand-Motive sowie sechs konservierte Transmembranshelices (Keller et al., 1998; Torres et al., 1998; Lambeth 2004). Die dritte und vierte Helix bindet jeweils zwei Hämgruppen über vier His-Reste. Die Hämgruppen übertragen Elektronen über die Zellmembran hinweg auf Sauerstoff, so dass H_2O_2 gebildet wird (Torres et al., 1998; Lambeth 2004). Der Aktivierung von NADPH-Oxidasen geht ein Anstieg der Konzentration an cytosolischen Ca^{2+} -Ionen voraus, welche von zellinternen Kompartimenten ausgeschüttet werden (Garnier et al., 2006). In *A. thaliana* kommen zehn verschiedene NADPH-Oxidasen vor, die gewebespezifisch exprimiert werden (Sagi und Fluhr, 2006). Diese werden neben anderen Stressformen auch durch Sauerstoffmangel induziert (Baxter-Burrell et al., 2002; Branco-Price et al., 2005). Da Hypoxie einen Ausstoß von mitochondrialen Ca^{2+} -Ionen in das Cytosol zur Folge hat (Subbaiah et al., 1998), könnten diese an der Aktivierung der NADPH-Oxidasen beteiligt sein. Somit könnten Mitochondrien und NADPH-Oxidasen eventuell beide eine Rolle in der Generierung von *Oxidative Bursts* unter Sauerstoffstress spielen.

Mehrphasige *Oxidative Bursts* wurden in Pflanzen bereits bei verschiedenen biotischen und abiotischen Stressformen wie Pathogenbefall (Torres et al., 2006; Kobayashi et al., 2007), Mykotoxinen (Peng et al., 2010), Ozon (Mahalingam et al., 2006), Cadmium (Garnier et al., 2006) sowie mechanischem Stress (Monshausen et al., 2009) beobachtet. Der Abstand zwischen den einzelnen Phasen beträgt dabei je nach Stressform wenige Sekunden bis mehrere Stunden. Den *Oxidative Bursts* geht eine erhöhte Aufnahme von Sauerstoff voraus (Bolwell et al., 1995), was auch bei den in dieser Arbeit durchgeführten Messungen zu beobachten war (siehe 3.1.1). Grund für dieses Phänomen ist möglicherweise die Regulierung von ROS durch Radikalfänger und Antioxidantien über eine positive Rückkopplungsschleife. So würde eine durch Stress ausgelöste Akkumulierung von ROS zu einer verstärkten Transkription von Genen führen, welche für ROS-detoxifizierende oder an der Produktion von Antioxidantien beteiligte Enzyme wie Superoxiddismutase, Ascorbatperoxidase, AOX, Glutathion-S-Transferase und Katalase kodieren (Mittler et al., 2004). Eine daraufhin sinkende ROS-Konzentration würde die Expression der oben genannten Gene wieder

herunterregulieren, was wiederum eine verstärkte Bildung von ROS aufgrund des immer noch andauernden Stresses zur Folge hätte. So wurde bei *A. thaliana*-Pflanzen unter Ozonstress beobachtet, dass die Menge an Ascorbat und Glutathion am geringsten war, wenn das Vorkommen an ROS am größten war (Mahalingam et al., 2006). Die Aktivierung von Katalase bei Pflanzen ist zudem kalziumabhängig (Yang und Poovaiah, 2002). Da sowohl bei Sauerstoffmangel als auch in Gegenwart von H_2O_2 mitochondriale Ca^{2+} -Ionen ins Cytoplasma ausgeschüttet werden (Subbaiah et al., 1998; Price et al. 1994), könnte Kalzium möglicherweise ebenfalls eine Rolle bei der Regulierung der ROS-Konzentration spielen. Stärke, Dauer und Intensität der *Oxidative Bursts* hängen sowohl von der Stressform als auch von dem Zusammenspiel der ROS-produzierenden und ROS-detoxifizierenden Signalwege ab (Mittler et al., 2004). Die mit fortlaufender Zeit kleiner werdende Amplitude der Ausschläge der Messkurve bei hypoxischem Stress lässt sich durch den fortschreitenden Sauerstoffmangel erklären, da zur Bildung von ROS Sauerstoff benötigt wird (Blokchina und Fagerstedt, 2010). Darüber hinaus ist bei fortschreitender Hypoxie ein Absterben der Zellen wahrscheinlich, so dass die Intensität der *Oxidative Bursts* mangels lebender Zellen geringer wird. Zur Überprüfung dieser Hypothese müsste in diesem Fall eine direkte Messung der ROS-Konzentration vorgenommen werden. Wäre dies der Fall, so könnte der Gehalt an Antioxidantien zum Zeitpunkt der höchsten und niedrigsten Konzentration an ROS bestimmt werden. Eine ähnliche Untersuchung der Transkriptionsraten und des Proteinvorkommens von ROS-detoxifizierenden Enzymen könnten weiterhin Aufschlüsse über die Regulierung der ROS-Produktion von *A. thaliana* unter hypoxischem Stress liefern.

4.2 Morphologie und Verhalten von Mitochondrien bei Hypoxie

Mitochondrien normoxischer Zellkulturen zeigten nach einer Anfärbung mit MitoTracker[®] Orange CM-H₂TMRos langgezogene, gekrümmte oder hantelförmige Strukturen. Eine dreistündige Inkubation unter hypoxischen Bedingungen führte zur Vereinzelung, zur Bildung von punktförmigen Strukturen sowie zu einer verringerten Größe. Eine Verlangsamung der mitochondrialen Bewegung im Cytoplasma wurde ebenfalls beobachtet. Oxidativer Stress besitzt einen ähnlichen Effekt auf die mitochondriale Ultrastruktur und Dynamik (Yoshinaga et al., 2005a; Scott und Logan, 2008). Die verringerte Größe könnte sich durch eine Veränderung des morphologischen Zustands der Mitochondrien erklären lassen, während die

verlangsamte Bewegung möglicherweise auf ATP-Mangel, ROS sowie eine Neuordnung im Cytoplasma zurückzuführen ist (van Gestel et al., 2002; Zhang und Xing, 2008). Mitochondrien im konventionellen Zustand verfügen über zahlreiche Cristae, sind extrem beweglich und vor allem in den die Vakuole durchziehenden Cytoplasmasträngen zu finden (Vartapetian et al., 2003; Logan und Leaver, 2000). Im verdichteten Zustand besitzen die Mitochondrien weniger Cristae, sind unbeweglich und befinden sich hauptsächlich im kortikalen Cytoplasma (Vartapetian et al., 2003; Logan und Leaver, 2000). Diese Veränderungen der äußeren mitochondrialen Morphologie werden durch Umstrukturierungen der Cristae verursacht (Logan und Leaver, 2000). Ursache dafür sind möglicherweise eine verstärkte Teilung der Organellen und ein Verlust des mitochondrialen Membranpotentials (Yoshinaga et al., 2005a; Scott und Logan, 2008; Logan, 2010). Die Ausbildung einer punktförmigen Struktur sowie eine Fragmentierung der Mitochondrien sind darüber hinaus Hinweise auf das frühe Stadium des durch ROS induzierten programmierten Zelltods (Yoshinaga et al., 2005b). Aufgrund der vermehrten Bildung von ROS unter hypoxischen Bedingungen (Rhoads et al., 2006) könnten diese Ergebnisse möglicherweise übertragbar sein. Eine sechsstündige Inkubation unter hypoxischen Bedingungen hatte eine Schwellung und verstärkte Aggregation der Mitochondrien zur Folge. Zusätzlich wurde eine Auflösung der mitochondrialen Struktur beobachtet. Derartige morphologische Veränderungen treten ebenfalls bei Anoxie sowie längerfristiger Behandlung mit ROS-induzierenden Chemikalien auf (Vartapetian et al., 2003; Yoshinaga et al., 2005b; Scott und Logan, 2008). Schwellungen sind ein Hinweis auf eine Veränderung der Durchlässigkeit der mitochondrialen Membran und Anzeichen des programmierten Zelltods (Curtis und Wolpert, 2002; Yoshinaga et al., 2005b). Da diese Strukturänderungen durch ROS, insbesondere durch H_2O_2 ausgelöst werden (Yao et al., 2002; Yao et al., 2004; Tiwari et al., 2002), könnten dies weitere Anzeichen für das Auftreten von *Oxidative Bursts* bei fortschreitender Hypoxie sein.

In den Zellen von Säugetieren und Hefen formen Mitochondrien ein dynamisches Netzwerk von Kompartimenten, deren Verbindungen untereinander durch ausbalancierte Fusion und Spaltung aufrechterhalten wird (Frazier et al., 2006; Perkins und Frey, 2000). Die Bildung solcher Netzwerke erleichtern möglicherweise die Signaltransduktion sowie den Fluss von Metaboliten und Energie durch die Zelle (Ichas et al., 1997). In pflanzlichen Zellen besteht die mitochondriale Population dagegen aus zahlreichen eigenständigen Organellen, deren Anzahl ebenfalls durch Fusion und Spaltung kontrolliert wird (Logan, 2006). Der Mechanismus der mitochondrialen Spaltung ist konserviert und beinhaltet bei Säugern, Hefen und höheren Pflanzen die Verwendung von dynaminartigen Proteinen und Proteinen vom Fis-

Typ (Logan, 2006). Homologe dieser Proteine kommen ebenfalls in *A. thaliana* vor. Die Familie der dynaminartigen Proteine besteht in dieser Pflanze aus fünf Mitgliedern, von denen DRP3a und DRP3b an der mitochondrialen Spaltung beteiligt sind (Arimura et al., 2004). AtFis1 besitzt zwei Isoformen (BIGYIN1, BIGYIN2), welche DRP3a und DRP3b in der mitochondrialen Membran verankern (Zhang und Hu, 2008; Logan, 2010). Sowohl DRP3a und DRP3b als auch BIGYIN1 und BIGYIN2 sind teilweise funktionell redundant (Zhang und Hu, 2008; Fujimoto et al., 2009). Bei Hefen und Säugetieren sind die an der mitochondrialen Spaltung beteiligten Proteine Dnm1 (Drp1), Fis1 und Mdv1/Net2 an der Regulierung des programmierten Zelltods beteiligt (Karbowski et al., 2004; Fannjiang et al., 2004). DRP3a und DRP3b scheinen in *A. thaliana* allerdings keine ähnliche Funktion zu besitzen (Yoshinaga et al., 2006). Für BIGYIN1 und BIGYIN2 wurden bisher keine derartigen Untersuchungen durchgeführt. Allerdings wurde eine verstärkte Expression des für BIGYIN2 kodierenden Gens unter hypoxischen Bedingungen beobachtet (Branco-Price et al., 2005), so dass ein Einfluss dieses Proteins auf die dem programmierten Zelltod vorausgehende mitochondriale Spaltung nicht ausgeschlossen werden kann. Über den genauen Ablauf der mitochondrialen Fusion bei Pflanzen ist bisher nichts bekannt. Von den bei Hefen an diesem Vorgang beteiligten Proteine Fzo1p, Ugo1p und Mgm1p besitzt nur Mgm1p ein Homolog in *A. thaliana*. Bei diesem handelt es sich um das oben erwähnte Protein DRP3a (Logan, 2010). Eine Durchführung von Hypoxieversuchen mit T-DNA-Insertionsmutanten für *DRP3a* und *DRP3b* sowie *BIGYIN1* und *BIGYIN2*, gefolgt von einer Untersuchung der mitochondrialen Morphologie könnte in diesem Fall weiteren Aufschluss über die Rolle dieser Proteine bei der Induzierung des programmierten Zelltods unter Sauerstoffmangel geben. Außerdem könnten Zeitrafferaufnahmen von *A. thaliana*-Zellkulturen während der Inkubation unter hypoxischen Bedingungen dabei helfen, mögliche Änderungen der Bewegung und zellulären Lokalisation von einzelnen Mitochondrien unter Sauerstoffmangel nachzuvollziehen.

4.3 Beeinflussung der Expression von *ATHSP26.3-mito*, *ATHSP23.6-mito*, *ATHSP22-mito*, *PHL*, *CML38*, *AOX1a* und *ATIDD14* durch Hypoxie

Die genaue Funktion sowie die einzelnen Komponenten des mitochondrialen retrograden Signalwegs wurden bisher nicht vollständig bestimmt. Über die Wahrnehmung von Hypoxie durch pflanzliche Mitochondrien ist ebenfalls wenig bekannt. Zur Untersuchung der Anpassung dieser Organellen an hypoxische Bedingungen durch retrograde Regulierung wurden sieben durch Sauerstoffmangel in ihrer Expression beeinflusste nukleär kodierte Gene mitochondrial lokalisierter Proteine identifiziert. Mittels bioinformatischer Methoden und GUS-Reportergenkonstrukten sollten anschließend Studien zur gewebe- und entwicklungsspezifischen Expression dieser Gene bei Hypoxie und Normoxie erstellt werden.

4.3.1 Unter hypoxischen Bedingungen heraufregulierte Gene

4.3.1.1 *ATHSP26.3-mito*, *ATHSP23.6-mito* und *ATHSP22-mito* (Gene dreier mitochondrialer kleiner Hitzeschockproteine)

Die Proteine *ATHSP26.3-mito* (At1g52560), *ATHSP23.6-mito* (At4g25200) und *ATHSP22-mito* (At5g51440) besitzen eine Größe von 26, 3 kDa, 23, 6 kDa und 22 kDa. Sie gehören zur Familie der kleinen Hitzeschockproteine (sHSP, HSP20). Diese sind 16 bis 42 kDa groß, universell und kommen in sämtlichen Kompartimenten der Zellen höherer Pflanzen vor (Scharf et al., 2001; Nakamoto und Vigh, 2007). Sie besitzen eine konservierte α -Crystallin-Domäne (ACD) und eine kompakte β -Faltblatt-Sandwichstruktur (Caspers et al., 1995; de Jong, 1998; Perez et al., 2009; Waters et al., 2008). Die β -Faltblattstrukturen bilden durch Dimerisierung große Oligomere aus 12 bis 24 Untereinheiten und stellen die funktionelle Form der sHSPs dar (van Montfort et al., 2002). Kleine Hitzeschockproteine sind sowohl an der normalen Entwicklung als auch an der pflanzlichen Stressantwort beteiligt (Sun und MacRae, 2005). Sie sorgen für Stabilität des zellulären Proteoms, indem sie an Signaltransduktion, Metabolismus, Translation, Transkription und anderen Vorgängen beteiligte Proteine bei Denaturierung vor irreversibler Aggregation schützen (Sun und MacRae, 2005). Bei diesem Vorgang dissoziieren die sHSP-Oligomere und legen hydrophobe

Oberflächen frei, die mit den jeweiligen Proteinen stabile Komplexe bilden (Haslbeck et al., 2004; Nakamoto und Vigh, 2007). Eine Kooperation mit ATP-abhängigen Chaperonsystemen wie DnaK/DnaJ/GrpE oder Hsp40/Hsp70 sorgt für die anschließende Rückfaltung der Proteine in ihre Originalstruktur (Nakamoto und Vigh, 2007). Kleine Hitzeschockproteine spielen ebenfalls eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Integrität von Membranen unter Einfluss von Stress. So bestimmt das mitochondriale kleine Hitzeschockprotein lmw HSP aus *Pyrus pumila* die Thermotoleranz der Oxidativen Phosphoryllierung, indem es Bestandteile des Komplex I vor Denaturierung durch Hitzestress bewahrt (Downs und Heckathorn, 1998). In *Zea mays* wirken mitochondriale kleine Hitzeschockproteine als Antioxidantien, die den Komplex I vor einer Denaturierung durch oxidativen Stress schützen (Hamilton und Heckathorn, 2001). Möglicherweise wird dieser Vorgang von spezifischen Interaktionen mit den in der Membran enthaltenen Lipiden gesteuert (Nakamoto und Vigh, 2007). Kleine Hitzeschockproteine treten vermehrt während der Samenreife auf und spielen eventuell eine Rolle als Chaperone in der Austrocknung, Samenruhe sowie im Keimungsvorgang (Wehmeyer et al., 1996).

A. thaliana verfügt über 19 kleine Hitzeschockproteine, die sich anhand ihrer subzellulären Lokalisation und Funktion in elf Unterfamilien einteilen lassen (Waters et al., 2008). ATHSP26.3-mito, ATHSP23.6-mito und ATHSP22-mito stellen die drei Vertreter der mitochondrial lokalisierten kleinen Hitzeschockproteine dar. Während ATHSP23.6-mito und ATHSP22-mito eng verwandt sind, bildet ATHSP26.3-mito eine eigene Klasse (Waters et al., 2008). Alle drei Gene wiesen bei dreistündiger Hypoxie erhöhte Transkriptraten auf (siehe 3.2.1.2). *ATHSP23.6-mito* und *ATHSP22-mito* zeigten diese Tendenz auch bei sechsstündiger Hypoxie, während bei *ATHSP26.3-mito* unter diesen Bedingungen kein Unterschied zur normoxischen Kontrolle beobachtet wurde (siehe 3.2.1.2). Die für *ATHSP23.6-mito* und *ATHSP22-mito* gezeigten Expressionsraten entsprechen somit in ihrer Tendenz den Literaturangaben (Branco-Price et al., 2005; Branco-Price et al., 2008). Für *ATHSP26.3-mito* wird dagegen eine sich mit fortschreitendem Sauerstoffmangel erhöhende Transkriptrate beschrieben (Branco-Price et al., 2005; Branco-Price et al., 2008). Dieser Unterschied zu den unter 3.2.1.2 beobachteten Werten läßt sich unter Umständen durch das unterschiedliche Ausgangsmaterial erklären. Die Expression von *ATHSP26.3-mito* unter hypoxischen Bedingungen könnte daher sowohl von der Dauer des Sauerstoffmangels als auch vom Alter der Pflanzen abhängig sein. Eine dritte Ursache könnten die zur Analyse der Transkriptraten verwendeten Methoden darstellen. Da die Tendenzen der anderen beiden Hitzeschockproteine den Literaturangaben entsprechen, ist dies allerdings wenig wahrscheinlich. Die beiden

Klassen mitochondrialer kleiner Hitzeschockproteine unterscheiden sich somit zeitlich in der Expression ihrer Gene bei Hypoxie. Daher könnten ATHSP23.6-mito und ATHSP22-mito möglicherweise eine Funktion im Schutz von mitochondrialen Proteinen bei einer mittleren Dauer des Sauerstoffmangels besitzen. ATHSP26.3-mito wäre dagegen je nach Alter der Pflanzen an einer frühen oder späten Antwort auf hypoxischen Stress beteiligt. Aufgrund von Expressionsstudien zu weiteren abiotischen Stressformen (siehe 3.2.1.3) ist es allerdings wahrscheinlich, dass diese beiden Proteine eher an einer allgemeinen als an einer durch Hypoxie ausgelösten Stressantwort beteiligt sind. Da *ATHSP26.3-mito* außerdem in homozygoten *knock-out*-Mutanten der Linie *athsp22-mito* vermehrt exprimiert wird (siehe 3.2.1.4), könnte bei diesem Protein unter Umständen eine funktionelle Redundanz vorliegen. Die Expressionsrate des Gens *ATHSP22-mito* ist von weiteren abiotischen Stressformen entweder nicht betroffen oder sie wird herunterreguliert. Daher spielt dieses Protein möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung mitochondrialer Proteine speziell unter Sauerstoffmangel.

Diese Hypothese könnte mit Assays zur Analyse der Elektronentransportkapazität der respiratorischen Komplexe unter Hypoxie überprüft werden. Durch Zugabe von zuvor isoliertem ATHSP26.3-mito, ATHSP23.6-mito und ATHSP22-mito könnte ein möglicher Einfluss mitochondrialer kleiner Hitzeschockproteine auf die Stabilität von Komplexen der Atmungskette untersucht werden. Für ATHSP26.3-mito bieten sich außerdem zusätzliche Analysen der Transkriptionsraten bei unterschiedlich alten Pflanzen unter Hypoxieeinfluss an.

4.3.1.2 *AOX1a* (Gen der Isoform 1a der Alternativen Oxidase)

Das Gen *AOX1a* (At3g22370) kodiert für die Isoform 1a der Alternativen Oxidase (AOX1a). Alternative Oxidasen kommen in Pflanzen, Pilzen und niederen Eukaryoten vor (van Aken et al., 2009). Sie stellen eine kleine Genfamilie dar, deren Mitglieder mitochondrial lokalisiert sind und als terminale Oxidasen der alternativen Elektronentransportkette fungieren. Alternative Oxidasen oxidieren Ubichinol direkt und sind nicht in der Lage, Protonen in den Intermembranraum zu pumpen. Die aus dem Elektronenfluss resultierende Energie wird stattdessen als Hitze frei (Rhoads und Subbaiah, 2007). Durch diesen Mechanismus lässt sich eine Überreduzierung des Chinonpools bei einer Unterbrechung der Atmungskette vermeiden (Zarkovic et al., 2005). Auf diese Weise wird die Bildung und Akkumulierung von ROS und somit oxidativer Schaden an mitochondrialen Lipiden, Proteinen und DNA vermindert

(Rhoads et al., 2006). Daher werden Alternative Oxidasen von einer Vielzahl von Stressformen induziert, die eine Störung der mitochondrialen Elektronentransportkette nach sich ziehen (Clifton et al., 2006). Ihre Gene gehören daher zu den am besten beschriebenen Zielgenen für Untersuchungen der mitochondrialen retrograden Regulierung (van Aken et al., 2009). In *A. thaliana* kommen fünf Isoformen der Alternativen Oxidase vor (Polidoros et al., 2009). Die Übereinstimmung der zugehörigen Proteinsequenzen variiert zwischen 55% und 82% (Clifton et al., 2006). Eine Expression der entsprechenden Gene findet mit Ausnahme von *AOX2* im Rahmen von Wachstum und Entwicklung von einer verstärkten ROS-Produktion betroffenen Geweben statt (siehe 3.2.2.1; Ye et al., 2000; Siddharta und Tuteja, 2007; Grobei et al., 2009; El-Maarouf-Bouteau und Bailly, 2008). *AOX1a* gehört in *A. thaliana* zu den am stärksten durch Stress induzierten Genen mitochondrial lokalisierter Proteine (Clifton et al., 2006). Aus diesem Grund wurde es als Positivkontrolle in die Untersuchungen mit aufgenommen. Eine verstärkte Expression von *AOX1a* wurde bei drei- und sechsstündiger Inkubation unter hypoxischen Bedingungen nachgewiesen (siehe 3.2.1.2). Damit wurden die Ergebnisse der Microarray-Analysen (Branco-Price et al., 2005; Branco-Price et al., 2008) bestätigt, welche erhöhte Transkriptraten dieses Gens bei zwei-, neun- und zwölfstündiger Hypoxie zeigten. Da diese Tendenz unabhängig von der Dauer des Versuchs und vom Ausgangsmaterial zu sein scheint, könnte *AOX1a* eventuell ein bei hypoxischem Stress kontinuierlich exprimiertes Gen darstellen. Das in dieser Arbeit ebenfalls untersuchte Gen der Isoform *AOX1b* wird im Gegensatz zu Branco-Price et al. nicht durch Hypoxie beeinflusst. Mögliche Ursachen für die abweichenden Ergebnisse könnten eventuell die unterschiedlichen Ausgangsmaterialien sowie Analysemethoden darstellen (siehe 4.3.1.1). Bei Sauerstoffmangel kommt es zu einer Überreduzierung des Chinonpools durch Inhibierung der Cytochrom-c-Oxidase (Rhoads et al., 2006). Dies führt zu einer verstärkten Bildung von ROS (Rhoads et al., 2006), was einem Ausstoß von mitochondrialen Ca^{2+} -Ionen ins Cytosol verursachen kann (Waypa et al., 2002). Kalzium stellt ein wichtiges Signalmolekül der mitochondrialen retrograden Regulierung dar und kann die Expression von *AOX* induzieren (Rhoads et al., 2006; Tsuji et al., 2000). Somit könnte die *AOX* eventuell die Bildung von ROS bei beginnender Hypoxie hinauszögern. Eine Funktion des Enzyms in der Neutralisierung von ROS bei fortschreitendem Sauerstoffmangel scheint allerdings wenig wahrscheinlich zu sein, da es nur eine schwache Affinität für Sauerstoff besitzt und seine Aktivität schon bei leichter Hypoxie einstellt (Szal et al., 2003; Igamberdiev et al. 2005). Starker oxidativer Stress kann außerdem zu einer Konvertierung in die inaktive disulfidgebundene Struktur führen (Vanlerberghe et al., 1999). Die Alternative Oxidase

definiert möglicherweise die Art der pflanzlichen Stressantwort. Die Abwesenheit von AOX1a führt zu einer veränderten die gesamte Zelle betreffenden Stressantwort (Clifton et al., 2006). Pflanzen ohne funktionelle AOX können nicht adäquat auf Stress reagieren und weisen daher stärkere Schäden auf (van Aken et al., 2009). So sind *aox1a*-Mutanten empfindlicher gegenüber Licht- und Trockenheitsstress (Giraud et al., 2008). Erhöhte Transkriptraten von AOX-Genen wurden zusätzlich bei einer Vielzahl von anderen biotischen und abiotischen Stressformen nachgewiesen. Darunter sind sowohl die mitochondriale Funktion beeinträchtigende Behandlungen als auch solche, die keinen direkten Effekt auf die Mitochondrien ausüben (Vanlerberghe und McIntosh, 1996; Clifton et al., 2005; Clifton et al., 2006; Zarkovic et al., 2005; Escobar et al., 2004; Escobar et al., 2006). Weiterhin kann eine erhöhte Konzentration an AOX den programmierten Zelltod durch Verminderung der ROS-Produktion hinauszögern. Daher besitzt dieses Enzym eventuell eine Pufferfunktion zur Bestimmung des Schwellenwerts für die Induzierung der Apoptose (van Aken et al., 2009). Aufgrund der fehlenden oxidativen Phosphoryllierung der alternativen Atmungskette hat die Aktivität der AOX ebenfalls Einfluss auf den Energiestatus der Zelle und ihre Homöostase. Somit könnte die AOX eine wichtige Rolle in der Programmierung der pflanzlichen Stressantwort spielen (van Aken et al., 2009). Die in dieser Arbeit beobachtete verstärkte Expression von *AOX1a* wäre daher nicht als spezifische Reaktion auf Hypoxie, sondern als Teil der allgemeinen pflanzlichen Stressantwort zu verstehen.

4.3.1.3 CML38 (Gen des calmodulinartigen Proteins CML38)

Das Gen *CML38* (At1g76650) kodiert für ein kalziumionenbindendes calmodulinartiges Protein. Calmoduline sind eukaryotische evolutionär konservierte Ca^{2+} -Sensoren. Sie bestehen aus zwei globulären je über ein Paar Ca^{2+} -bindende EF-Hand-Domänen verfügende Regionen. Die Bindung von Kalziumionen veranlasst eine Konformationsänderung und darauffolgende Freilegung von hydrophoben Regionen, welche mit spezifischen Zielmolekülen wie Kinasen, metabolischen und cytoskelettalen Proteinen, Ionenpumpen und -kanälen sowie Transkriptionsfaktoren interagieren (Bouché et al., 2005). Die Familie der calmodulinartigen Proteine in *A. thaliana* besteht aus 50 Mitgliedern, von denen CML37 (At5G42380), CML39 (At1g76640) und CML38 eine eigene Untergruppe bilden. Die Identität der Aminosäuresequenzen beträgt bei CML38 und CML37 51,4% und bei CML37 und CML39 52,2%. Die Sequenzen von CML38 und CML39 sind zu 76,1% identisch

(McCormack und Braam; 2003). Die Transkriptrate von *CML38* erhöht sich bei fortdauernder Hypoxie. Diese Tendenz wurde sowohl in dieser Arbeit als auch bei Branco-Price et al. beobachtet und scheint somit unabhängig von Gewebetyp und vom Alter der Pflanzen zu sein. Die Transkriptrate des für *CML38* kodierenden Gens wird zusätzlich durch eine Vielzahl von anderen Stressformen beeinflusst (siehe 3.2.1.3). *CML38* benötigt zur Induzierung den ethylenabhängigen Transkriptionsfaktor RAV2 (Endres et al., 2010). Ethylen ist neben der Antwort auf zahlreiche biotische und abiotische Stressformen (Dietz et al., 2010; Wang et al., 2002) auch an der Weiterleitung des hypoxischen Signals beteiligt (Steffens und Sauter, 2010; Wang et al., 2002), so dass hier eventuell ein Zusammenhang bestehen könnte. Calmoduline und calmodulinartige Proteine spielen eine Rolle in der Auswertung von Ca^{2+} -Signalen während der pflanzlichen Stressantwort und Entwicklung (Vanderbeld und Snedden, 2007). Kalzium stellt einen allgegenwärtigen sekundären Botenstoff in eukaryotischen Signaltransduktionskaskaden dar (Tuteja und Majahan, 2007; Cheng et al., 2002), dessen Ausschüttung ins Cytosol durch Sauerstoffmangel, Kälte, osmotischen und oxidativen Stress verursacht werden kann (Subbaiah et al., 1998; Rhoads und Subbaiah, 2007). Dieser Anstieg der cytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration folgt eng definierten räumlichen und zeitlichen Mustern und bedarf daher einer genauen Kontrolle (Rizzuto et al., 2009). Die Ca^{2+} -Ionen stammen entweder aus dem extrazellulären Raum oder aus zellinternen Kalziumspeichern, zu denen neben der Vakuole, der Kernhülle, dem endoplasmatischen Retikulum und den Chloroplasten auch die Mitochondrien gehören (Cheng et al., 2002). Die Regulierung der Ca^{2+} -Aufnahme und Abgabe durch die Zellkompartimente erfolgt durch komplexe Interaktionen zwischen Ionenpumpen und -kanälen sowie Austauschern und bindenden Proteinen. Diese werden entweder direkt durch Ca^{2+} -Ionen oder indirekt über Calmoduline, calmodulinabhängige Proteinkinasen oder calmodulinartige Proteine aktiviert (Rizzuto et al., 2009; Moreau et al., 2006). So ist bei Säugetieren die Aktivierung des mitochondrialen Kalzium-Uniporters MCU calmodulinabhängig (Moreau et al., 2006). Calmoduline beeinflussen weiterhin die Öffnung der mitochondrialen Pore (Odagiri et al., 2009). *CML38* ist mitochondrial und möglicherweise auch cytoplasmatisch lokalisiert (siehe 3.3). Es könnte daher eventuell mit mitochondrialen Kalziumkanälen interagieren und an der Induzierung des erhöhten mitochondrialen Kalziumausstoßes bei Stress beteiligt sein. Die erhöhten Transkriptraten wären mitunter auf eine positive Rückkopplung zurückzuführen. Ca^{2+} -Ionen stimulieren weiterhin unter Mitwirkung von Calmodulinen die ROS-entgiftenden Enzyme Katalase und Glutathionreduktase (Feissner et al., 2009). Daher kann eine Mitwirkung von *CML38* an der ROS-Homöostase nicht ausgeschlossen werden. Im Cytoplasma käme für

CML38 eine Funktion in der Erkennung, Weiterleitung und Verstärkung des Ca^{2+} -Signals in Frage. Physiologische Untersuchungen zeigten, dass ein verstärktes Vorkommen von CML38 mit permanent geöffneten Stomata einhergeht (Vanderbelt und Snedden, 2007). Unter hypoxischen Bedingungen wäre dies unter Umständen von Vorteil, da die Pflanze auf diese Weise über einen effizienteren Gasaustausch verfügen würde. Einer der beiden Mechanismen zur Regulierung der Öffnung von Stomata ist von Änderungen der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration abhängig (Hetherington und Woodward, 2003; Hetherington und Brownlee, 2004). Daher könnte CML38 zusätzlich an der Weiterleitung dieses Kalziumsignals beteiligt sein. Eventuell beeinflusst dieses Protein die zur Stomataöffnung notwendigen Anionenkanäle. Diese Hypothese ließe sich mittels entsprechender *knock-out* T-DNA-Insertionsmutanten überprüfen. Durch die Identifizierung von Bindungspartnern könnte weiterhin eine mögliche Rolle von CML38 in der Regulierung mitochondrialer Ca^{2+} -Kanäle untersucht werden. Darüber hinaus bieten sich Expressionsstudien der Gene der mit CML38 verwandten Proteine CML37 und CML39 an, deren Transkriptraten bei zwölfstündiger Hypoxie ebenfalls erhöht sind (Branco-Price et al. 2005; Branco-Price et al., 2008). Im Anschluss könnten ähnliche Methoden wie bei der Untersuchung von CML38 helfen, die Funktion dieser Untergruppe der calmodulinartigen Proteine bei hypoxischem Stress in *A. thaliana* näher zu charakterisieren.

4.3.2 Unter hypoxischen Bedingungen herunterregulierte Gene

4.3.2.1 *PHL* (Gen einer putativen Helikase)

Das Gen *PHL* (At2g05080) kodiert für eine putative Helikase. Pflanzliche DNA-Helikasen kommen im Nukleus, in den Chloroplasten und in den Mitochondrien vor. Sie lösen mithilfe durch Hydrolyse von NTP gewonnener Energie die Basenpaarungen doppelsträngige DNA-Moleküle auf und entwinden diese (Tuteja, 2003). Aus diesem Grund sind diese Proteine unentbehrlich für die Replikation des Genoms und die Transkription von Genen. Die in dieser Arbeit charakterisierte putative Helikase *PHL* wird in den Annotationen des ATH1-Microarrays der Firma Affymetrix als verwandt zu einer PIF1-Helikase aus *Schizosaccharomyces pombe* beschrieben. Mitglieder der PIF1-Familie sind stark konserviert und kommen bei allen Eukaryoten vor (Boulé und Zakian, 2006). In *S. pombe* ist die PIF1-Helikase Pfh1p essentiell für die Instandhaltung von nukleärer und mitochondrialer DNA

(Pinter et al., 2008). In *Saccharomyces cerevisiae* kodiert *PIF1* für eine an der Reparatur und Rekombination von mitochondrialen DNA beteiligte 5'–3' DNA-Helikase (Lahaye et al., 1991). Darüber hinaus interagiert dieses Protein mit der N-Glykosylase Ntg1p, um die Integrität des mitochondrialen Genoms bei oxidativem Stress zu erhalten (Doudican et al., 2005). Das Fehlen von PIF1 führt zu Verlust und fehlerhafter Reparatur von mitochondrialer DNA (Wagner et al., 2006; Boulé und Zakian, 2006). Die PIF1-Helikase entwindet sowohl DNA-DNA- als auch RNA-DNA-Duplexe, wobei die Affinität für RNA-DNA-Substrate höher ist (Pinter et al., 2008; Boulé und Zakian, 2007). *A. thaliana* verfügt neben der in dieser Arbeit beschriebenen mitochondrial lokalisierten putativen Helikase noch über drei weitere Homologe zu PIF1, die mitochondrial, plastidär, im Nukleus und im Cytosol lokalisiert sein können (Bochmann et al., 2010; Christensen et al., 2005; Heazlewood et al., 2007).

Erhöhte Transkriptraten von *PHL* treten bei Normoxie im Embryo, Samen, Pollen, Apikalmeristem sowie in den Stamen und Karpellen auf (siehe 3.2.2.1). Bei dreistündiger Inkubation unter hypoxischen Bedingungen ist die Expression von *PHL* herunterreguliert (siehe 3.2.1.2), während sie bei sechsstündiger Hypoxie hochreguliert ist. In der Literatur wurde eine verstärkte Expression dieses Gens erst nach zwölfstündiger Hypoxie gezeigt (Branco-Price et al., 2005). Eine zwei- sowie neunstündige Inkubation bei Sauerstoffmangel beeinflusst die Transkriptrate nicht (Branco-Price et al., 2008). Als mögliche Ursache für die abweichenden Ergebnisse wären die unterschiedlich angesetzten Hypoxieversuche zu nennen (siehe 4.3.1.1). Das Gen der Helikase *PHL* wäre demnach bei der frühen Antwort auf hypoxischen Stress in seiner Expression herunterreguliert, während bei einer mittleren bis späten Stressantwort eine verstärkte Transkription stattfinden würde. Eine diesbezügliche gewebespezifische Expression von *PHL* könnte ebenfalls wahrscheinlich sein. Eine weitere mögliche Ursache könnte die in dieser Arbeit zur Untersuchung der Transkriptsraten verwendete Methode darstellen (siehe 4.3.1.1). Eine verminderte Expression von *PHL* kommt außerdem bei osmotischem, oxidativem Salz- und Trockenheitsstress vor, während sie durch andere Stressformen nicht beeinflusst wird (siehe 3.2.1.3). Aufgrund der verminderten Expression von *PHL* unter diesen abiotischen Stressformen und als frühe Antwort auf Hypoxie könnte diese putative Helikase eventuell an der Herunterregulierung von mitochondrial kodierten Genen beteiligt sein. Die verstärkte Expression des für *PHL* kodierenden Gens nach sechsstündiger Hypoxie könnte auf eine Funktion dieses Proteins ähnlich wie bei den PIF1-Helikasen in der Reparatur und im Schutz der mitochondrialen DNA hinweisen.

Studien zur Koexpression mitochondrial kodierter Gene sowie eine Identifizierung der Bindungspartner könnten zur Aufklärung einer möglichen Funktion der putativen Helikase PHL in der Regulierung mitochondrialer DNA beitragen. Durch die Analyse von *knock-out*-Mutanten und Überexpressionslinien ließe sich zusätzlich ein möglicher Einfluss von PHL auf das Wachstum und die Entwicklung von *A. thaliana* untersuchen.

4.3.2.2 *ATIDD14* (Indeterminate Domain 14)

Das von *ATIDD14* (At1g68130) kodierte Protein gehört zur Familie der ID-Domänen (IDD) enthaltenden C2H2-Transkriptionsfaktoren. Die Bezeichnung leitet sich von dem Indeterminate 1 (ID1)-Gen aus *Zea mays* ab, welches für die Induzierung der Blühphase verantwortlich ist (Colasanti et al., 1998). Mutanten ohne funktionelles ID1-Gen blühen später als Wildtyp-Pflanzen und weisen Anomalien in der Blütenbildung auf (Colasanti et al., 1998). Die ID-Domäne ist stark konserviert und kommt in allen höheren Pflanzen vor. Sie besitzt eine putative nukleäre Importsequenz am N-terminalen Ende, auf die vier verschiedene Zinkfinger motive folgen. Von diesen sind die inneren beiden für die Bindung an eine elf Basenpaare lange Konsensussequenz (TTTGTCGTTTT) der DNA verantwortlich (Kozaki et al., 2004; Colasanti et al., 2006). In *A. thaliana* wurden bisher 16 ID-Domänen enthaltende Proteine identifiziert. Von diesen bilden *ATIDD14*, *ATIDD15* und *ATIDD16* eine eigene Untergruppe, die außer der ID-Domäne über keine weiteren konservierten Sequenzen verfügt (Colasanti et al., 2006). *ATIDD15* ist wahrscheinlich an der Bildung lateraler Wurzeln, am Gravitropismus von Schößlingen sowie an der Akkumulierung von Stärke beteiligt (Colasanti et al., 2006; Tanimoto et al., 2008). Die Funktion von *ATIDD14* und *ATIDD16* wurde bisher nicht untersucht. Die Transkriptrate von *ATIDD14* ist bei Hypoxie herunterreguliert (Branco-Price et al., 2005; Branco-Price 2008; siehe 3.2.1.2). Während die bei Branco-Price et al. ermittelten Werte auf eine mittlere bis späte Antwort auf hypoxischen Stress hinweisen, wurde in dieser Arbeit eine stark verminderte Expression als frühe bis mittlere Stressantwort beobachtet. Die Ursache für die widersprüchlichen Daten könnte möglicherweise wiederum im unterschiedlichen Ausgangsmaterial und in den verwendeten Methoden zu finden sein (siehe 4.3.1.1). *ATIDD15* und *ATIDD16* weisen bei Sauerstoffmangel keine veränderte Transkriptrate auf (Branco-Price et al., 2005; Branco-Price et al., 2008). Somit stellt *ATIDD14* den einzigen auf Transkriptionsebene durch Hypoxie beeinflussten Vertreter dieser Untergruppe der IDD-Proteinfamilie in *A. thaliana* dar. Da bereits für andere

Transkriptionsfaktoren mit C2H2-Zinkfingerdomäne eine subzelluläre Lokalisation in den Mitochondrien nachgewiesen wurde (Schwacke et al., 2007) und diese sowohl an DNA und RNA binden können als auch an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt sind (Englbrecht et al., 2004), könnte ATIDD14 möglicherweise eine Rolle bei der Transkription von mitochondrialen Genen spielen. Aufgrund der verminderten Transkriprate bei Hypoxie, der geringen Beeinflussung durch andere abiotische Stressformen (siehe 3.2.1.3) und der Expression des entsprechenden Gens in der gesamten Pflanze (siehe 3.2.2.1) könnte der Transkriptionsfaktor ATIDD14 möglicherweise eine wichtige Funktion in der negativen Regulierung von hypoxiebeeinflussten Genen bei mittel- bis längerfristigem Sauerstoffmangel besitzen.

Zur Untersuchung der Rolle von ATIDD14 bei hypoxischen Stress müssten zunächst die durch diesen Transkriptionsfaktor regulierten Gene identifiziert werden. Dies könnte durch die Analyse von der Konsensussequenz der ID-Domäne entsprechenden DNA-Bindestellen erreicht werden. Ebenfalls möglich wären Studien von unter hypoxischen Bedingungen koexprimierten Genen. Untersuchungen mit T-DNA-Insertionsmutanten könnten weiterhin zur Charakterisierung der Funktion dieses C2H2-Zinkfinger-Transkriptionsfaktors bei hypoxischem Stress beitragen.

Insgesamt gesehen lassen sich die Gene des Transkriptionsfaktors ATIDD14 sowie des 22 kDa großen mitochondrialen kleinen Hitzeschockproteins ATHSP22-mito als spezifisch durch Hypoxie beeinflusst definieren, während die veränderten Expressionsraten der übrigen fünf Gene wohl eher Teil einer allgemeinen mitochondrialen Stressantwort sind. Zur Überprüfung dieser Hypothese sind daher weitere Studien notwendig. So würden z. B. Hypoxieversuche von kürzerer oder längerer Dauer als drei und sechs Stunden, gefolgt von einer anschließenden Untersuchung des Transkriptoms, weitere Aufschlüsse über Gene mitochondrial lokalisierter Proteine geben, die eher an einer frühen oder späten Antwort auf hypoxischen Stress beteiligt sind. Des Weiteren wurden 49 der 65 mittels *Genevestigator*-Analysen als durch Hypoxie beeinflusst identifizierten Gene mitochondrial lokalisierter Proteine noch nicht genauer untersucht. Da diese durch Hypoxie weniger stark beeinflusst sind als die in dieser Arbeit untersuchten Gene oder keine mögliche Funktion in der mitochondrialen retrograden Regulierung besitzen, wurden sie in dieser Arbeit nicht weiter berücksichtigt. Bei einigen dieser Gene könnten sich eventuell weitere Untersuchungen anbieten.

4.4 Erstellung von GUS-Reportergenkonstrukten für den Nachweis von Hypoxie bei *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen

Zum direkten Nachweis von hypoxischem Stress in *A. thaliana*-Pflanzen wurden in dieser Arbeit GUS-Reportergenkonstrukte erstellt. Diese basieren auf der Fusion der Promotoren der unter 3.2.1.2 identifizierten hypoxiebeeinflussten Gene mit dem Gen für β -Glukuronidase (*gusA*). Durch eine GUS-Färbung der Blätter putativer Transformanten wurden sechs $P_{ATIDD14}$:GUS-Linien und vier P_{CML38} :GUS-Linien identifiziert. Bei weiteren Experimenten mit aus Samen der putativen Transformanten gezogenen Pflanzen wurde das Ergebnis der GUS-Färbung nicht reproduziert. Eine Untersuchung der DNA dieser Pflanzen mittels PCR führte lediglich zum Nachweis des für Neomycinphosphotransferase II kodierenden Gens. Demnach ist die Kanamycinresistenz auf eine unvollständige Übertragung der T-DNA zurückzuführen, bei der das *gusA*-Gen nicht in das Genom der Pflanzen integriert wurde. Die beobachtete Blaufärbung wäre in diesem Fall ein Artefakt, an dessen Entstehung möglicherweise endogene β -Glukuronidasen von *A. thaliana* beteiligt waren. Diese sind im sauren Bereich um einen pH-Wert von 4.0 bis 5.0 aktiv. Das pH-Optimum der als Reportergen verwendeten β -Glukuronidase aus *E. coli* liegt bei 7.0, so dass keine Interferenzen der beiden Proteine auftreten sollten (Jefferson et al., 1987; Sudan et al., 2006). Für eine der drei endogenen Glukuronidasen, AtGUS2 (At5g07830), wurde allerdings eine etwa 20%ige Aktivität bei einem pH-Wert von 7.0 nachgewiesen. Diese reicht für ein detektierbares Signal aus (Eudes et al., 2008). Die in dieser Arbeit beobachtete GUS-Färbung trat allerdings nicht beim Wildtyp auf und konnte mit aus Samen der putativen Transformanten gezogenen Pflanzen nicht reproduziert werden. Eine alleinige Hintergrundfärbung durch AtGUS2 kann somit ausgeschlossen werden. Ein weiterer Grund für die Färbung der Blätter liegt eventuell in der Kultivierung der Pflanzen. Diese musste aufgrund von baulichen Maßnahmen in einer Klimakammer stattfinden, deren Einstellungen für das Wachstum von *A. thaliana* nicht optimal waren, so dass es zum Befall mit Schimmelpilzen kam. Zum anderen wurden die Pflanzen während dieser Zeit von Trauermücken (*Sciaridae*) und Thripsen (*Thysanoptera*) befallen, so dass für die GUS-Färbung nicht genügend gesundes Gewebe der putativen Transformanten zur Verfügung stand. Pathogenbefall löst bei Pflanzen eine hypersensitive Stressantwort aus. Pflanzliche Glykosidhydrolasen sind an der chemischen Abwehr von Herbivoren beteiligt (Barth und Jander, 2006). Weiterhin spielen sie eine wichtige Rolle bei der Regulierung von Phytohormonen als Reaktion auf abiotischen Stress (Lee et al., 2006). Analysen von

Microarray-Daten mit dem Programm *Genevestigator* zeigten eine verstärkte Expression von *AtGUS1*, *AtGUS2* und *AtGUS3* bei biotischem Stress. Aufgrund des vermehrten Vorkommens dieser Proteine könnte daher ein detektierbares Signal trotz des suboptimalen pH-Wertes möglich sein. Daher könnte die beobachtete Blaufärbung des Gewebes der putativen Transformanten eventuell durch die endogenen Glukuronidasen hervorgerufen worden sein. Die fehlende Färbung des Wildtyp-Blattes lässt sich durch die Tatsache erklären, dass aufgrund der größeren Anzahl dieser Pflanzen für den Versuch auf gesundes Gewebe zurückgegriffen werden konnte. Eine ähnliche Begründung lässt sich für spezifische Färbung von Blättern der als Positivkontrolle verwendeten Linie P_{DR5} :GUS finden. Daher wurden in dieser Studie lediglich die Vektorkonstrukte erstellt sowie die Transformation von Wildtyp-Pflanzen mit anschließender Ernte der Samen durchgeführt. Promotor:GUS-Pflanzen der sieben hypoxiebeeinflussten Gene wurden nicht generiert.

4.5 Beeinflussung der Expression von *CPK22* und *CPK23* durch Hypoxie

Kalziumabhängige Proteinkinasen (CDPKs) sind möglicherweise an der durch hypoxischen Stress ausgelösten mitochondrialen retrograden Regulierung beteiligt. Diese Proteine stellen effektive Schalter für die Transduktion von Kalziumsignalen in Pflanzen dar (Damman et al., 2003). Sie sind an der Signaltransduktion von Phytohormonen und abiotischem Stress beteiligt (Rhoads und Subbaiah, 2007; Das und Pandey, 2010; Shen et al., 2006; Finkelstein et al., 2002; Munemasa et al., 2011; Nakata et al., 2009). Sie verfügen über jeweils eine Proteinkinasedomäne und eine calmodulinartige, aus Ca^{2+} -bindenden EF-Hand-Motiven aufgebaute Domäne zur direkten Bindung von Kalzium. Die Kinaseaktivität ist daher von Calmodulinen unabhängig. Zusätzlich besitzen CDPKs eine autoinhibitorische und eine variable N-terminale Domäne. Bis auf die letztere sind alle Domänen stark konserviert (Cheng et al., 2002). Die Aktivität dieser Proteine wird durch Interaktionen zwischen der autoinhibitorischen, der calmodulinartigen und der Proteinkinasedomäne reguliert. Bei einer geringen Konzentration an freiem Ca^{2+} ist die autoinhibitorische Domäne durch die Kinasedomäne gebunden, so dass die Rate der Substratphosphoryllierung gering bleibt. Die Bindung von Ca^{2+} an die calmodulinartige Domäne führt zu einer Konformationsänderung. Das Pseudosubstrat löst sich von der katalytischen Stelle und führt zu einer Aktivierung des Enzyms (Harmon et al., 1994). Die N-terminale Domäne enthält möglicherweise

Informationen zur subzellulären Lokalisierung oder Substratspezifität (Harper et al., 1994). *A. thaliana* besitzt 34 Mitglieder dieser Proteinfamilie, die sich voneinander durch die Länge und Zusammensetzung ihrer N-terminalen Domäne unterscheiden und in vier Gruppen eingeteilt werden (Cheng et al., 2002). Die in dieser Arbeit untersuchten kalziumabhängigen Proteinkinasen CPK22 (At4g04710) und CPK23 (At4g04740) gehören zur dritten, CPK25 (At2g35890) dagegen zur ersten Gruppe (Day et al., 2002). Eine Untersuchung der entsprechenden Gene mittels quantitativer Real Time PCR zeigte erhöhte Transkriptraten von *CPK22* und *CPK23* in *A. thaliana*-Wildtyp-Zellkulturen bei dreistündiger Hypoxie. Die Expression des Gens *CPK25* wies starke Schwankungen auf (siehe 3.3.2). Laut Literaturangaben ist das für CPK25 kodierende Gen bei sieben Tage alten Keimlingen nach zwei- und zwölfstündiger Hypoxie herunterreguliert, während es nach neunstündiger Hypoxie heraufreguliert ist (Branco-Price et al., 2005; Branco-Price et al., 2008). Die in dieser Arbeit durchgeführte dreistündige Inkubation der *A. thaliana*-Zellkulturen unter hypoxischen Bedingungen würde sozusagen in die „Übergangsphase“ fallen, so dass in diesem Fall keine Veränderung der Transkriptsrate beobachtet werden konnte. Die Expression von *CPK22* und *CPK23* könnte neben Dauer und Art des Sauerstoffmangels auch vom verwendeten Ausgangsmaterial abhängig sein. Eine Untersuchung von 14 Tage alten für sechs Stunden im Dunkeln gefluteten Pflanzen zeigte eine erhöhte Transkriptsrate des Gens *CPK22*. Die Expression von *CPK23* wies keinen Unterschied zur normoxischen Kontrolle auf (siehe 3.3.2). Bei CPK22 wäre somit eine mögliche Funktion in der Reaktion auf mittel- bis längerfristigen Sauerstoffmangel wahrscheinlich. CPK23 könnte eventuell an einer frühen Antwort auf hypoxischen Stress beteiligt sein. Für die Expressionsraten von *CPK22* wurde eine ähnliche Tendenz in der Literatur gezeigt, während dies bei *CPK23* nicht der Fall war (Branco-Price et al., 2005; Branco-Price et al., 2008). Ein möglicher Grund für die beobachteten Unterschiede könnte die Verwendung von unterschiedlichem Ausgangsmaterial sowie die abweichenden Inkubationsbedingungen darstellen. Weiterhin ist CPK23 in *A. thaliana* an der für die Schließung der Stomata essentielle Transduktion von Ca^{2+} -Signalen beteiligt (Geiger et al., 2010). Bei Dunkelheit und Überflutung kommt es zur Schließung der Stomata (Hosy et al., 2003; Pezeshki et al., 1996a; Mao et al., 2005). Sind diese einmal geschlossen, könnte eine verstärkte Expression von *CPK23* eventuell negative Auswirkungen auf den Schließmechanismus besitzen. Dies hätte möglicherweise Priorität über die Weiterleitung des Hypoxiesignals, so dass bei Überflutung und Dunkelheit trotz Sauerstoffmangel keine verstärkte Expression von *CPK23* stattfinden würde. Da Zellkulturen keine Schließzellen besitzen, könnte CPK23 in dieser Gewebeform nur an der Weiterleitung

des Hypoxiesignals beteiligt sein. Die von Branco-Price et al. als Ausgangsmaterial verwendeten sieben Tage alten Keimlinge wurden zur Erzeugung von Hypoxie unter Schwachlichtbedingungen mit Argon begast, so dass eine Schließung der Stomata nicht nötig wäre. Auf diese Weise könnten sich die abweichenden Ergebnisse erklären lassen. Eine weitere mögliche Ursache könnte die verwendete Methode darstellen. Bei einer quantitativen Real Time PCR werden für jedes Gen spezifische Oligonukleotide verwendet. Sowohl Anlagerungstemperatur als auch Elongationszeit können daher optimiert werden.

Die Transkriptrate von *CPK22* wird durch andere abiotische Stressformen nicht beeinflusst. *CPK23* weist nur bei Kältestress eine verminderte Expression auf (siehe 3.5.3.). Aus diesem Grund könnten sowohl *CPK22* als auch *CPK23* möglicherweise spezifisch an der durch Sauerstoffmangel ausgelösten Signaltransduktion beteiligt sein.

4.6 Veränderte Expression nukleär kodierter Gene mitochondrial lokalisierter Proteine unter Hypoxie in T-DNA-Insertionsmutanten der Linien *cpk22* und *cpk23*

Zur Überprüfung einer mögliche Funktion von *CPK22* und *CPK23* in der mitochondrialen retrograden Signaltransduktion bei Sauerstoffmangel wurden die Folgen eines *knock-downs* bzw. *knock-outs* von *CPK22* und *CPK23* auf die Transkription von kernkodierten Genen mitochondrial lokalisierter Proteine analysiert. Untersucht wurden die Transkriptraten von *ATHSP26.3-mito*, *ATHSP23.6-mito*, *ATHSP22-mito*, *ATIDD14*, *PHL*, *CML38* und *AOX1a*, da diese definitiv hypoxiebeeinflusst sind (siehe 3.2.1). Das Gen der Untereinheit II der Cytochrom-c-Oxidase (*COXII*, AtMg00160) diente aufgrund der mitochondrialen Kodierung als Kontrolle (Unseld et al., 1997). Demzufolge sollte es außer im Falle eines Rückkopplungseffektes von einer Störung der retrograden Signaltransduktion nicht betroffen sein. Die Ergebnisse der quantitativen Real Time PCR zeigten unter hypoxischen Bedingungen in den T-DNA-Insertionsmutanten weniger stark beeinflusste Expressionsraten der nukleär kodierten Gene als im Wildtyp (siehe 3.3.4). Der Effekt war mit Ausnahme von *ATHSP26.3-mito* bei Pflanzen der Linie *cpk22* ausgeprägter als bei der Linie *cpk23*. Die verstärkte Expression von *ATHSP26.3-mito* in Pflanzen der Linie *cpk23* unter Hypoxie läßt sich eventuell durch die Regulierung dieses Gen von einer Vielzahl anderer abiotischer Stressformen erklären (siehe 3.2.1.3). Es könnte daher möglicherweise neben dem *CPK23*-

abhängigen Weg auch durch andere Signaltransduktionskaskaden induziert werden. Die Expression von *COXII* wies keine Unterschiede auf. Aufgrund dieser Ergebnisse könnten CPK22 und CPK23 unter Umständen an der durch Hypoxie ausgelösten mitochondrialen retrograden Signaltransduktion beteiligt sein.

4.7 Kein Hinweis auf funktionelle Redundanz bei *CPK22* und *CPK23*

Das Ausschalten des Gens *CPK23* beeinflusste die Expression von sechs der sieben nukleär kodierten Gene mitochondrial lokalisierter Proteine weniger stark als dies bei *knock-down* Pflanzen der Linie *cpk22* der Fall war. Die Gene *CPK22* und *CPK23* befinden sich zusammen mit *CPK21*, *CPK27* und *CPK31* hintereinander in einer Region an der Spitze des vierten Chromosoms, werden in dieselbe Richtung transkribiert und sind eng verwandt (Hrabak et al., 2003). Die Expression von *CPK21* und *CPK27* wird durch Hypoxie nicht beeinflusst, während für *CPK31* keine diesbezüglichen Daten vorhanden waren (Branco-Price et al., 2005; Branco-Price et al., 2008). Daher könnte eventuell ein Fall von funktioneller Redundanz vorliegen. Diesbezügliche Untersuchungen zeigten unter hypoxischen Bedingungen keine verstärkte Expression von *CPK22* in Pflanzen der Linie *cpk23* im Vergleich zum Wildtyp. Gleiches wurde für die Transkriptrate von *CPK23* in Pflanzen der Linie *cpk22* gezeigt (siehe 3.3.5). Daher sind CPK22 und CPK23 möglicherweise nicht funktionell redundant.

Eine Generierung von *cpk22:cpk23* Doppel-*knock-out*-Mutanten könnte weitere Hinweise auf eine mögliche Interaktion von CPK22 und CPK23 bei der hypoxischen Stressantwort liefern. Eine mögliche funktionelle Redundanz von CPK21, CPK27 und CPK31 für CPK22 und CPK23 könnte ebenfalls untersucht werden. Vor allem die kalziumabhängige Proteinkinase CPK21 bietet sich für weitere Versuche dieser Art an, da sie zusammen mit CPK23 den Anionenkanal SLAC1 der Schließzellen reguliert (Geiger et al., 2010). Durch Reporteranalysen ließe sich weiterhin das Verhalten von CPK22 und CPK23 unter hypoxischen Bedingungen *in vivo* untersuchen. In *Mesembryanthemum crystallinum* konnte mit dieser Methode gezeigt werden, dass eine durch Trockenheitsstress aktivierte kalziumabhängige Proteinkinase mit einem Bestandteil des Cytoskeletts interagiert und von ihrer ursprünglichen Lokalisation in der Plasmamembran in den Nukleus wandert (Patharkar und Cushman, 2006). Ähnliche Untersuchungen mit CPK22 und CPK23 in *A. thaliana*

könnten eventuell weitere Aufschlüsse über die Art und Weise der mitochondrialen retrograden Signaltransduktion liefern. Über einen semi-degradierten Proteinassay (Vlad et al., 2008) würden sich weiterhin eventuelle spezifische Phosphorylationssequenzen bestimmen lassen. Auf diese Weise ließe sich dann mittels bioinformatischer Methoden nach möglichen Substraten suchen. Diese könnten mittels split-YFP-basierten Untersuchungen oder Hefe-2-Hybridsystemen auf eine tatsächliche Interaktion mit CPK22 oder CPK23 überprüft werden. Mit diesen Methoden ließen sich weitere mögliche Interaktionspartner von CPK22 und CPK23 identifizieren. Auf diese Weise könnte die weitere Prozessierung von durch Hypoxie ausgelösten Signalen entlang des mitochondrialen retrograden Signalwegs untersucht werden.

4.8 Lokalisation der Proteine ATHSP26.3-mito, ATIDD14, CML38, PHL, ATHSP23.6-mito, ATHSP22-mito und CPK22

Für die genaue Charakterisierung eines Proteins ist die Bestimmung seiner korrekten subzellulären Lokalisation unerlässlich. Durch den komplexen kompartimentierten Aufbau der eukaryotischen Zelle ergeben sich zahlreiche Möglichkeiten. Die Genauigkeit der Methoden kann allerdings stark variieren. Bioinformatische Vorhersagen können sich je nach verwendetem Programm voneinander unterscheiden. Sie eignen sich aufgrund ihrer schnellen und einfachen Durchführung eher für die Vorauswahl entsprechender Proteine. Eine genauere Methode stellt die Fraktionierung von Zellkompartimenten, gefolgt von massenspektrometrischen Untersuchungen der darin enthaltenden Proteine dar. Fehler bei der Fraktionierung sowie der Aufreinigung und Analyse der Proteine können aber auch hier zu falschen Ergebnissen führen. Eine exakte Bestimmung der subzellulären Lokalisation lässt sich mit Hilfe von Fusionsproteinen durchführen. Auf diese Weise wurde für die Isoform 1a der Alternativen Oxidase (AOX1a, At3g22370) eine mitochondriale Lokalisation und für die kalziumabhängige Proteinkinase CPK23 (At4g04740) eine Lokalisation in der Plasmamembran ermittelt (Carrie et al., 2009; Geiger et al., 2010). Der Transkriptionsfaktor ATIDD14 ist laut Literaturangaben nukleär lokalisiert (Lee et al., 2005). Die Verteilung der GFP-Fluoreszenz könnte auf eine zusätzliche mitochondriale Lokalisation schließen lassen (siehe Abbildung 4.1).

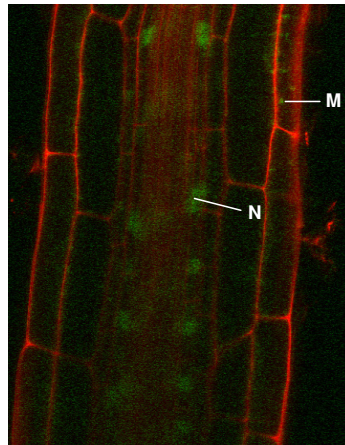


Abbildung 4.1: Subzelluläre Lokalisation von ATIDD14 nach Lee et al., 2005.

Gezeigt ist die am konfokalen Laserscanning-Mikroskop erstellte Längsaufnahme einer Wurzel von *A. thaliana*. Grün: ATIDD14:GFP; rot: Zellwand (Farbstoff nicht bekannt); N: Nukleus; M: möglicherweise Mitochondrium.

Bioinformatische Vorhersagen ergaben einen Hinweis auf eine mögliche mitochondriale oder nukleäre Lokalisation dieses Proteins (siehe 3.4). Die Angaben für die drei kleinen mitochondrialen Hitzeschockproteine ATHSP26.5-mito, ATHSP22-mito, ATHSP23.6-mito sowie für das calmodulinartige Protein CML38, die putative Helikase PHL und die kalziumabhängige Proteinkinase CPK22 basieren auf den Annotationen des Affymetrix-Microarrays ATH1, massenspektrometrischen Untersuchungen (Benschop et al., 2007; Heazlewood et al., 2004) und in dieser Arbeit durchgeführten bioinformatischen Vorhersagen. Je nach verwendeter Methode oder Programm widersprachen sich die Ergebnisse und ließen keine eindeutige Bestimmung der intrazellulären Lokalisation zu (siehe 3.4). So wird den Proteinen ATHSP22-mito, CML38, PHL, ATHSP23.6-mito und ATHSP22-mito laut bioinformatischer Vorhersagen eine mitochondriale Lokalisation zugeordnet. Viele mitochondrial lokalisierte Proteine oder deren Ortho- bzw. Paraloge können aber auch in den Peroxisomen vorkommen (Gabaldón et al., 2006). Da viele peroxisomale Proteine außerdem aus ehemals mitochondrial lokalisierten Proteinen hervorgegangen sind (Gabaldón et al., 2006), können diesbezügliche Vorhersagen zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Die Vorhersagen des Programms *SubLoc* (Hua und Sun, 2001) weisen auf zusätzliche nukleäre oder cytoplasmatische Lokalisationen dieser Proteine hin. Zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation *in vivo* wurden daher GFP-Fusionskonstrukte erstellt. Eine transiente Transformation von *A. thaliana*-Wildtyp-Protoplasten, gefolgt von einer Analyse am konfokalen Laserscanning-Mikroskop sollte eine exakte Bestimmung der subzellulären Lokalisation ermöglichen. Die Inkubationszeit nach der Transformation wurde auf maximal acht Stunden beschränkt, da die transformierten Protoplasten nicht länger lebensfähig waren. Ein Grund dafür liegt wahrscheinlich in der Überexpression von GFP. Die innere

mitochondriale Membran weist eine stark gefaltete Struktur auf. Sie stellt die am dichtesten mit Proteinen besetzte Membran in der Zelle dar. Daher verändert ein überexprimiertes Fremdprotein möglicherweise die Zusammensetzung der Membran und somit ihre Integrität (Jakobs, 2004). Die endogenen Proteine könnten durch GFP eventuell verdrängt oder beschädigt werden, was die Funktion der Mitochondrien und somit auch die Lebensfähigkeit der Protoplasten einschränken würde. Die Ergebnisse der *in vivo*-Lokalisationsversuche zeigten eine mitochondriale Lokalisation von ATSHP26.3-mito, ATHSP23.6-mito, ATHSP22-mito, PHL, CML38 und ATIDD14. Die kalziumabhängige Proteinkinase CPK22 ist im Cytosol lokalisiert. Die Verteilung der GFP-Fluoreszenz läßt bei CML38 zusätzlich auf eine cytoplasmatische Lokalisation schließen (siehe 3.4). Das calmodulinartige Protein CML38 wird in der Literatur als in der Plasmamembran lokalisiert beschrieben (Benschop et al., 2007). Diese Aussage basiert auf massenspektrometrischen Untersuchungen membranassoziierter Phosphopeptide. Mitochondrien können neben ihrem beweglichen Zustand auch im kortikalen Cytoplasma über Mikrotubuli in der Plasmamembran verankert vorkommen (Mao et al., 2005). Daher wäre ein Vorkommen von mitochondrialen Proteinen in einer Fraktion von Plasmamembranen durchaus wahrscheinlich. In den Annotationen des ATH1-Microarrays der Firma Affymetrix ist CML38 als plastidär lokalisiert aufgeführt. Diesbezügliche Untersuchungen wurden nicht durchgeführt, da die Protoplasten aufgrund der Anzucht im Dunkeln keine funktionellen Chloroplasten besaßen. Da Chloroplasten zu den Kalziumspeichern der pflanzlichen Zelle gehören (Cheng et al., 2002), könnte eine zusätzliche plastidäre Lokalisation wahrscheinlich sein. Diese Hypothese ließe sich durch eine Transformation von *A. thaliana*-Pflanzen oder im Licht angezogenen Zellkulturen mit dem zugehörigen Reportergenkonstrukt überprüfen. Durch den Vergleich der Autofluoreszenz der Chloroplasten mit dem GFP-Signal könnten Rückschlüsse auf eine eventuelle plastidäre Lokalisation gezogen werden. Der Transkriptionsfaktor ATIDD14 wird als nukleär lokalisiert beschrieben (Lee et al., 2005). Im Gegensatz dazu wurde in den unter 3.4 durchgeführten Untersuchungen für ATIDD14 eine mitochondriale Lokalisation gezeigt. Da alle Mitglieder der IDD-Proteinfamilie über eine putative nukleäre Importsequenz in ihrer ID-Domäne verfügen (Colasanti et al., 2006), wäre eine rein mitochondriale Lokalisation dieses Proteins unwahrscheinlich. ATIDD14 besitzt zwei Spleißvarianten (Annotationen der Datenbank TAIR, <http://www.arabidopsis.org/>). Laut bioinformatischen Vorhersagen ist längere, aus 419 Aminosäuren bestehende Version nukleär lokalisiert, während die kürzere, 333 Aminosäuren lange Sequenz sowohl nukleär als auch mitochondrial lokalisiert sein kann. Da in dieser Arbeit eine mögliche mitochondriale Lokalisation dieses Transkriptionsfaktors untersucht

werden sollte, wurde auf die kürzere Spleißvariante zurückgegriffen. Ein Sequenzvergleich beider Varianten zeigte eine fehlende putative nukleäre Importsequenz bei der kürzeren Version (siehe 3.4). Dies könnte den Grund für die in dieser Arbeit gezeigte rein mitochondriale Lokalisation von ATIDD14 darstellen. Transkriptionsfaktoren der C2H2-Zinkfingerfamilie können nukleär, mitochondrial und plastidär lokalisiert sein (Morita et al., 2006; Schwacke et al., 2007). Die Art der Lokalisation könnte bei ATIDD14 eventuell durch alternatives Spleißen bestimmt werden. Um diese Hypothese zu überprüfen, müssten ebenfalls *in vivo*-Lokalisationsversuche mit der längeren Spleißvariante durchgeführt werden.

4.9 Verminderung der plastidären Kontamination durch zweifache Aufreinigung

Eine exakte Untersuchung des mitochondrialen Proteoms lässt sich nur unter Verwendung möglichst reiner Mitochondrien erreichen. Deshalb muss eine Kontamination mit Plastiden oder anderen Zellkompartimenten vermieden oder zumindest reduziert werden. Daher wurde eine mögliche Verminderung der plastidäre Kontamination durch zwei nacheinander durchgeführte Aufreinigungen der mitochondrialen Fraktion über einen Saccharosedichtegradienten untersucht. Als Ausgangsmaterial wurden Infloreszenzen von *Brassica oleracea* var. *botrytis* verwendet, die ähnlich wie im Dunkeln angezogene *A. thaliana*-Zellsuspensionen statt funktionellen Chloroplasten lediglich Proplastiden besitzen. Da beide Arten zur Familie der *Brassicaceae* gehören, kann von ähnlichen Ergebnissen ausgegangen werden. Im Gesamtprotein der über einen einfachen Gradienten aufgereinigten Mitochondrienfraktion wurde ein Protein nachgewiesen, welches mit einer Größe von etwa 37 kDa der der plastidären MPBQ/MSBQ-Methyltransferase aus *A. thaliana* entsprechen würde und vermutlich deren Ortholog darstellt. Im Gesamtprotein der über einen doppelten Saccharosegradienten aufgereinigte Mitochondrienfraktion erfolgte kein entsprechender Nachweis. Somit wurde die plastidäre Kontamination durch die zweimalige Aufreinigung deutlich verringert. Weiterhin wurde der Hinweis auf ein mögliches Ortholog der MPBQ/MSBQ-Methyltransferase aus *A. thaliana* in *B. oleracea* var. *botrytis* erbracht. Für eine Verifizierung müsste das Protein aufgereinigt und mittels Massenspektrometrie analysiert werden.

4.10 Identifizierung von elf hypoxiebeeinflussten Proteinen mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese und MALDI-TOF/TOF-Analyse

Funktion und Häufigkeit von mitochondrial lokalisierten Proteinen sind neben der Regulierung auf Transkriptionsebene (Kleffmann et al., 2004) von der Kontrolle der organellären Genexpression (Leon et al., 1998; Choquet und Wollman, 2002), dem posttranslationalen Proteinimport (Glaser et al., 1998; Taylor et al., 2003a) und der korrekten Faltung und Anordnung der Proteine in den Hüllmembranen abhängig (Leister, 2005). Die mitochondriale RNA-Editierung sowie das *cis*- und *trans*-Spleißen von Introns der Gruppe II spielen unter Umständen ebenfalls eine Rolle (Hinrichsen et al., 2009). Da diese Vorgänge bei Expressionsstudien nicht berücksichtigt werden, wurde der Einfluss von Hypoxie auf das mitochondriale Proteom durch zweidimensionale Gelelektrophorese und MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometrie untersucht. Dies führte zur Identifizierung von elf Proteinen. Für dreizehn weitere Proteinspots wurden keine zugehörigen Proteine identifiziert. Mögliche Gründe dafür liegen eventuell in einer zu geringen Proteinmenge, einer zu hohen Salzkonzentration oder einer unvollständigen Eluierung der Peptide aus der zur Aufreinigung verwendeten Säule.

4.10.1 Unter hypoxischen Bedingungen vermehrt vorkommende Proteine

4.10.1.1 ATSLP-mito (mitochondrial lokalisiertes stomatinartiges Protein)

Bei ATSLP-mito (At4g27585) handelt es sich um ein zur PID-Proteinfamilie gehörendes stomatinartiges Protein mit einem Molekulargewicht von 45 kDa (Borner et al., 2005; Morgan et al., 2008). Die Proteinfamilie PID (**P**roliferation, **I**on, **D**eath) wurde nach den Funktionen der Mitglieder ihrer drei Untergruppen benannt. Prohibitine sind an der Zellvermehrung beteiligt (engl. Proliferation), Stomatine regulieren die Ionenkanalaktivität und die an hypersensitiven Reaktionen beteiligten HIR-Proteine beeinflussen den programmierten Zelltod (Nadimpalli et al., 2000). Allen gemeinsam sind ähnliche primäre und sekundäre Proteinstrukturen und Hydropathieprofile (Nadimpalli et al., 2000; van Aken et al., 2010). Stomatine wurden zuerst in den Erythrocyten von Säugetieren entdeckt. Dort stellen sie

integrale Membranproteine dar, welche die Durchlässigkeit der Membran im Bezug auf Kationen, insbesondere von K^+ -Ionen, regulieren (Stewart et al., 1993). Dies geschieht möglicherweise durch eine Assoziation der Stomatine mit den Transmembranhelices der Transporter, die auf diese Weise stabilisiert werden (Stewart et al., 1993). Bei höheren Pflanzen wurden Stomatine außer bei *A. thaliana*, welche neben ATSLP-mito noch über ein weiteres mitochondrial lokalisiertes Homolog (At5g54100) verfügt (Scheible et al., 2003; Heazlewood et al., 2004), bisher nur bei *Z. mays* entdeckt (Nadimpalli et al., 2000). Bioinformatische Untersuchungen ergaben eine starke strukturelle Ähnlichkeit zwischen tierischen und pflanzlichen Stomatinen (Nadimpalli et al., 2000). Daher sind Stomatine in Pflanzen eventuell ebenfalls an der Regulierung von Kationenkanälen beteiligt (Nadimpalli et al., 2000). Untersuchungen von HeLa-Zellen führten zur Identifizierung eines eng mit der inneren mitochondrialen Membran assoziierten Stomatins (SLP-2). Es wird bei mitochondrialem Stress verstärkt exprimiert und stabilisiert möglicherweise Prohibitine sowie Untereinheiten der Komplexe I und IV (Da Cruz et al., 2008). Das in dieser Arbeit identifizierte stomatinartige Protein ATSLP-mito ist in den Mitochondrien sowie in der Plasmamembran lokalisiert (Heazlewood et al., 2004; Mitra et al., 2007). Im mitochondrialen Proteom kommt ATSLP-mito bei hypoxischem Stress vermehrt vor (siehe 3.5.3). Die Regulierung findet bereits auf Transkriptebene statt (siehe 3.5.4). Sauerstoffmangel führt zu einer Unterbrechung der Atmungskette (Rhoads et al., 2006). Die daraufhin verstärkte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) hat eine Aktivierung mitochondrialer Kaliumkanäle zur Folge (Pastore et al., 2007). Eine erhöhte Importrate von Kaliumionen in die Mitochondrien führt zu deren Anschwellung, verstärkter Produktion von Hitze und verminderter ROS-Produktion (Ruy et al., 2004). Somit spielen pflanzliche mitochondriale Kaliumkanäle neben dem Entkoppelnden Protein (UCP) und der Alternativen Oxidase (AOX) eine wichtige Rolle in der Vermeidung von oxidativem Stress (Ruy et al., 2004). Ihre Regulierung erfolgt möglicherweise durch einen Rückkopplungsmechanismus (Pastore et al., 2007), an dem auch Stomatine beteiligt sein könnten. Da ATSLP-mito in der gesamten Pflanze exprimiert wird (siehe 3.5.4), spielt es eventuell eine Rolle in diesem Vorgang. Eine Stabilisierung von Prohibitinen und Komplexen der Atmungskette unter hypoxischem Stress käme ebenfalls in Frage. Zur genauen Charakterisierung der Funktion von ATSLP-mito könnte die Durchlässigkeit der inneren mitochondrialen Membran bezüglich Kaliumionen analysiert werden. Als Ausgangsmaterial bieten sich Mitochondrien aus *A. thaliana* Wildtyp-Pflanzen sowie aus *knock-down* T-DNA-Insertionsmutanten der Linie *atslp-mito* an. Anhand

der Identifizierung von möglichen Bindungspartnern ließe sich ein eventueller Einfluss von ATSLP-mito auf mitochondriale Proteine untersuchen.

4.10.1.2 AtGSTF6 (Glutathion-S-Transferase 6)

Glutathion-S-Transferasen (GSTs) sind an der Einlagerung von Anthocyanen in die Vakuole, an der Entgiftung von Herbiziden und Hydroxyperoxiden und an der Regulierung der Apoptose beteiligte dimerische Enzyme (Banerjee und Goswami, 2010; Gill und Tuteja, 2010). Sie katalysieren die Konjugation einer Reihe von elektrophilen Verbindungen wie cytotoxische Stoffe und Produkte der reaktiven Oxidation mit dem Tripeptid Glutathion (Gill und Tuteja, 2010; Banerjee und Goswami, 2010). Glutathion-S-Transferasen kommen bei Tieren, Pflanzen, Pilzen und Bakterien vor. Pflanzliche GSTs werden durch diverse biotische und abiotische Stimuli induziert und schützen die Zelle vor oxidativen Schäden (Sappl et al., 2009). Sie binden an die Phytohormone Auxin und Cytokinin und beeinflussen möglicherweise deren Aktivität (Smith et al., 2003). Das in dieser Arbeit identifizierte 23, 47 kDa große Protein AtGSTF6 (At1g02930) gehört zur Phi-Klasse der GST-Familie, die nur bei Pflanzen vorkommt (Sappl et al., 2009; Wagner et al., 2002). Diese umfaßt in *A. thaliana* 13 Mitglieder mit hauptsächlich detoxifizierender Funktion (Sappl et al., 2009; Edwards et al., 2000). AtGSTF6 ist in den Mitochondrien, in der Vakuole, im Cytosol sowie in der Plasmamembran lokalisiert (Heazlewood et al., 2007) und an der Detoxifizierung und der pflanzlichen Stressantwort beteiligt (Loeffler et al., 2005; Reymond et al., 2004). Das entsprechende Gen wird in der gesamten Pflanze exprimiert, wobei stark erhöhte Werte in seneszenten Blättern, Kotyledonen und Sepalen auftreten (siehe 3.5.4). Erhöhte Transkriptionen treten ebenfalls bei ATP-Mangel und oxidativem Stress auf (Wagner et al., 2002; Chivasa et al., 2005). Eine verstärkte Expression von *ATGSTF6* und ein vermehrtes Vorkommen auf Proteinebene unter hypoxischen Bedingungen wurden in dieser Arbeit gezeigt (siehe 3.5.3 und 3.5.4). Da in den Mitochondrien ATP-Mangel und oxidativer Stress in Verbindung mit Hypoxie auftreten, könnte ATGSTF6 in den Mitochondrien unter Umständen an der Detoxifizierung der bei Sauerstoffmangel verstärkt gebildeten ROS beteiligt sein. Diesbezügliche Untersuchungen mit T-DNA-Insertionsmutanten ohne funktionelle AtGSTF6 sowie Studien mit Überexpressionslinien könnten die Funktion dieses Proteins bei Hypoxie näher charakterisieren.

4.10.1.3 Glykolytische Enzyme

Die 27, 37 kDa große cytosolische Triosephosphatisomerase (ATCTIMC, At3g55440) und die 60, 9 kDa große cytosolische 2,3-biphosphoglyceratunabhängige Phosphoglyceratmutase (ATPGAM-i-cyto, At3g08590) sind an der Glykolyse und Glukoneogenese beteiligt (Plaxton, 1996). ATCTIMC katalysiert die Reaktion von Dihydroxyacetonphosphat zu Glycerinaldehyd-3-Phosphat (Anderson, 1971), während ATPGAM-i-cyto reversibel 2-Phosphoglycerat in 3-Phosphoglycerat umwandelt (Graña et al., 1989). *A. thaliana* besitzt zwei Triosephosphatisomerasen. Eine davon ist plastidär lokalisiert (Chen und Thelen, 2010), während ATCTIMC funktionell mit den Mitochondrien assoziiert ist (Giegé et al., 2003). Unter den funktionell mit den Mitochondrien assoziierten glykolytischen Enzymen befindet sich eine weitere 2,3-biphosphoglyceratunabhängige Phosphoglyceratmutase (At1g09780). Eine bioinformatische Analyse mit dem Programm „EMBOSS“ ergab eine 93,2%ige Verwandtschaft zu ATPGAM-i-cyto. Aus diesem Grund könnte es sich um zwei Isoformen handeln. Da für ATPGAM-i-cyto eine Lokalisation im Apoplast und im Cytosol gezeigt wurde (Binschedler et al., 2008; de la Fuente van Bentem et al., 2008), ist eine mitochondriale Assoziation nicht auszuschließen. *ATCTIMC* und *ATPGAM-i-cyto* werden in der gesamten Pflanze stark exprimiert (siehe 3.5.4), was auf die Wichtigkeit der entsprechenden Proteine für den pflanzlichen Stoffwechsel hinweist. Das vermehrte Vorkommen von ATCTIMC und ATPGAM-i-cyto im mitochondrialen Proteom unter Hypoxie lässt sich durch eine mitochondriale Assoziation und eine verstärkte Bildung glykolytischer Enzyme bei Sauerstoffmangel erklären (Mustroph et al., 2009; Igamberdiev und Gardeström, 2003). Hypoxie führt zur Inhibierung der mitochondrialen Respiration, so dass alternative Stoffwechselwege zur Produktion von ATP und zur Regenerierung von NAD⁺ aus NADH benötigt werden (Gupta et al., 2009; Rocha et al., 2010). Diese Aufgabe kann von einem modifizierten Tricarbonsäurezyklus und vom Gärstoffwechsel übernommen werden (Rocha et al., 2010; Tadege et al., 1999). Die Gärung verwendet das in der Glykolyse gebildete Pyruvat als Substrat und produziert in zwei Reaktionen entweder Laktat oder Ethanol (Tadege et al., 1999). Laktat senkt den pH-Wert der Zelle und ist somit längerfristig giftig. Ethanol diffundiert in kürzester Zeit aus der Zelle hinaus. Dies führt bei fortdauernder Hypoxie zu einem Verlust an Kohlenstoff (Rocha et al., 2010). Durch die mitochondriale Assoziation können die Stoffwechselzwischenprodukte der Glykolyse den Mitochondrien direkt zur Verfügung gestellt werden. Eine Prozessierung der Intermediäre durch energetisch weniger günstige kompetitive Stoffwechselwege mitsamt der Nebeneffekte würde so verhindert

(Graham et al., 2007). Da eine Akkumulierung des während der Glykolyse produzierten Pyruvats zur Aktivierung von AOX führt und mit der durch Hypoxie induzierten Inhibierung der Respiration interferiert (Vanlerberghe et al., 1999; Gupta et al., 2009), erfolgt bei Sauerstoffmangel eine gleichzeitige Synthese von Alanin aus Pyruvat und Glutamat (Miyashita und Good, 2008). Das dabei gebildete 2-Oxoglutarat wird von dem modifizierten Trikarbonsäurezyklus über einen oxidierenden Stoffwechselweg zu Succinat umgesetzt. (Rocha et al., 2010). Auf diese Weise wird doppelt so viel ATP produziert, wie es durch Glykolyse allein der Fall wäre (Rocha et al., 2010). Während die Transkriptrate von *ATPGAM-i-cyto* unter hypoxischen Bedingungen erhöht ist, wurde für *ATCTIMC* keine Veränderung der Expression beobachtet (siehe 3.5.4). Die mitochondriale Assoziation glykolytischer Enzyme ist dynamisch, so dass die Lokalisation dieser Proteine von dem jeweiligen Bedarf der Mitochondrien an Substraten abhängt (Graham et al., 2007). Die Regulierung erfolgt möglicherweise durch posttranslationale Modifikationen oder von Metaboliten induzierte Konformationsänderungen (Graham et al., 2007). In diesem Fall könnte das Vorkommen der Triosephosphatisomerase *ATCTIMC* im mitochondrialen Gesamtprotein durch die mitochondriale Assoziation dieses Proteins unter hypoxischen Bedingungen hervorgerufen worden sein. Die genaue Lokalisation unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen könnte sich *in vivo* durch die Fusion von *ATCTIMC* und *ATPGAM-i-cyto* mit einem Reporterprotein untersuchen lassen.

4.10.1.4 ATB2 (Oxidoreduktase)

Laut einer Untersuchung der funktionellen Domänen mit dem Programm *InterProScan* (Zdobnov und Apweiler, 2001) handelt es sich bei dem 38, 36 kDa großen Protein *ATB2* (At1g60710) um eine Oxidoreduktase. Diese Gruppe von Enzymen ist an Redoxreaktionen beteiligt. In dieser Arbeit wurde eine eventuelle mitochondriale Lokalisation oder Assoziation von *ATB2* gezeigt. Bioinformatische Vorhersagen befürworten eine Lokalisation in den Mitochondrien und im Cytosol (Heazlewood et al., 2007). *ATB2* wird in der gesamten Pflanze exprimiert. Erhöhte Transkriptsraten treten im Stängel, im Hypokotyl und in der Blüte auf (siehe 3.5.4). Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen weisen unter hypoxischen Bedingungen auf ein verstärktes Vorkommen von *ATB2* auf Proteinebene hin (siehe 3.5.3). Die Transkriptrate von *ATB2* wird durch Hypoxie nicht verändert (Branco-Price et al., 2005; Branco-Price et al., 2008). Mitochondriale Oxidoreduktasen stellen wichtige Bestandteile

aller Komplexe der Atmungskette dar, wo sie an der Produktion von ROS beteiligt sind (Esterházy et al., 2008; Berry et al., 1991; Kita et al., 1990; Blokhina und Fagerstedt, 2010). Da bei Sauerstoffmangel durch eine Unterbrechung der Atmungskette vermehrt ROS gebildet werden (Rhoads et al., 2006), könnte ATB2 eventuell an diesem Vorgang beteiligt sein. ATB2 wird möglicherweise durch ebenfalls zur Produktion von mitochondrialen ROS führenden Cadmiumstress beeinflusst (Sarry et al., 2006; Bi et al., 2009). Es wird außerdem durch Auxin induziert (Cao et al., 2006), so dass eine wachstums- und entwicklungsbezogene Funktion möglich sein könnte. Näheren Aufschluss über die Funktion von ATB2 würden eventuell eine genaue Bestimmung der subzellulären Lokalisation und eine Identifizierung von möglichen Bindungspartnern mittels eines Hefe-Zwei-Hybridsystems ergeben.

4.10.1.5 BPA1 (Bindungspartner von ACD11)

Das nukleinsäurenbindende Peptid BPA1 (At5g16840) besitzt ein Molekulargewicht von 27 kDa. Es gehört zur Familie der RBD-Proteine. Diese verfügen über eine RNA-bindende Domäne (RBD) (Maris et al., 2005). Wichtig für die RNA-Bindung sind zwei Konsensussequenzen. Eine davon besteht aus acht konservierten aromatischen und positiv geladenen Aminosäureresten in der Mitte der RBD-Domäne, während sich die zweite aus sechs weniger stark konservierten Aminosäureresten bestehende Sequenz am N-terminalen Ende befindet (Maris et al., 2005). RBD-Proteine sind an Protein-Protein-Interaktionen und an allen posttranskriptionalen Vorgängen beteiligt (Maris et al., 2005). Laut bioinformatischer Vorhersagen (Heazlewood et al., 2007) und den unter 3.5.2 und 3.5.3 aufgeführten Ergebnissen ist BPA1 möglicherweise im Cytosol und in den Mitochondrien lokalisiert und kommt unter hypoxischen Bedingungen vermehrt vor. Das entsprechende Gen wird in der gesamten Pflanze exprimiert, wobei erhöhte Werte in den Stamen, im Embryo und im Samen auftreten (siehe 3.5.4). BPA1 besitzt Oxidoreduktaseaktivität und interagiert mit dem Protein ACD11 (Accelerated Cell Death 11, At2g34690) sowie mit den Rab-GTPase-Akzeptoren ATPRA7 (At1g55190) und ATPRA8 (At3g13720) (Petersen et al., 2009). Der aus BPA1, ACD11, ATPRA7 und ATPRA8 bestehende Proteinkomplex ist eventuell am Transport von Proteinen über Membranen hinweg sowie an der Regulierung des Sphingolipidhaushalts beteiligt (Brodersen et al., 2001; Petersen et al., 2009). Sphingolipide kommen unter anderem in den Mitochondrien vor (Kitagaki et al., 2007). Ihre Metabolite sind am Transfer von Proteinen der Zellwand, an der Bildung von ROS sowie der Weiterleitung von

Kalziumsignalen beteiligt (Lynch und Dunn, 2004; Borner et al., 2005; Shi et al., 2007; Ng et al., 2001). Sie spielen eine Rolle im Schließmechanismus der Stomata sowie im programmierten Zelltod (Ng et al., 2001). Laut bioinformatischer Vorhersagen ist ACD11 im Nukleus, im Cytosol sowie in den Mitochondrien lokalisiert (Heazlewood et al., 2007). Eine Fehlfunktion dieses Proteins führt zur Auslösung und Beschleunigung des programmierten Zelltods. Pflanzen mit dieser Mutation weisen eine höhere Menge an Sphingolipiden auf, sind kleiner und zeigen eine ausgeprägte Chlorose (Brodersen et al., 2002). Ausschalten und Überexpression von *BPA1*, *ATPRA7* und *ATPRA8* in *A. thaliana* führen zu keinem erkennbaren Phänotyp (Petersen et al., 2009). Daher sind diese Proteine entweder nicht essentiell oder müssen für einen Effekt gleichermaßen betroffen sein. Da bei Sauerstoffmangel zusätzlich zu dem vermehrten Vorkommen von *BPA1* die Expression von *ATPRA8* und *ATPRA7* herunterreguliert ist (Branco-Price et al., 2005; Branco-Price et al., 2008; Banti et al., 2008), käme unter Umständen das letztere in Frage. Die unter hypoxischen Bedingungen veränderte Zusammensetzung des ACD11-Proteinkomplexes könnte eventuell eine negative Wirkung auf die Stabilität von ACD11 besitzen. Somit könnte der ACD11-Proteinkomplex möglicherweise eine Rolle in der Induzierung der Apoptose bei Sauerstoffmangel spielen. Zur Überprüfung dieser Hypothese wäre eine exakte Bestimmung der subzellulären Lokalisation der vier Proteine mittels Reportergenkonstrukten notwendig. Durch die Generierung von Doppel- und Dreifach-*knock-out*-Mutanten könnte ein mögliches Zusammenspiel von *ATPRA7*, *ATPRA8* und *BPA1* in der Regulierung von ACD11 untersucht werden. Durch Messungen des Sphingolipidgehalts bei Normoxie und Hypoxie könnte die Rolle dieser Verbindungen bei Sauerstoffmangel untersucht werden. Weiterhin könnte eine Identifizierung der mit *ATPRA7* und *ATPRA8* assoziierten Rab-GTPasen zum Verständnis der Funktion des ACD11-Proteinkomplexes unter hypoxischen Bedingungen beitragen.

4.10.1.6 S-Adenosylmethioninsynthetasen (MAT2 und MAT3)

S-Adenosylmethioninsynthetasen (MATs) katalysieren die Biosynthese von S-Adenosylmethionin. Dieses stellt den wichtigsten Donor für Methyl in transmethylierenden Reaktionen dar und dient als Substrat für die Produktion von Polyaminen und des Phytohormons Ethylen (Wang et al., 2002; Lindermayr et al., 2006). Bei *A. thaliana* wurden bisher vier für S-Adenosylmethioninsynthetasen kodierende Gene gefunden (Lindermayr et

al., 2006). Bei den in dieser Arbeit identifizierten S-Adenosylmethioninsynthetasen handelt es sich um MAT2 (At4g01850) und MAT3 (At2g36880), die ein Molekulargewicht von 33, 76 kDa bzw. 42, 93 kDa besitzen. Unter hypoxischen Bedingungen ist die Transkriprate von *MAT3* herunterreguliert, während *MAT2* keine veränderte Expression aufweist (Branco-Price et al., 2005; Branco-Price et al., 2008). Dies widerspricht dem in dieser Arbeit beobachteten vermehrten Vorkommen von MAT2 und MAT3 auf Proteinebene (siehe 3.5.3). Da in der Literatur keine Hinweise auf eine mitochondriale Lokalisation oder Assoziation gefunden wurden und das Molekulargewicht dieser Proteine nicht mit den Ergebnissen der zweidimensionalen Gelelektrophorese übereinstimmt, handelt es sich bei MAT2 und MAT3 wahrscheinlich um Kontaminationen. Über das Vorkommen bei Sauerstoffmangel auf Proteinebene kann daher keine klare Aussage getroffen werden. Möglicherweise werden diese beiden Proteine posttranskriptionell reguliert. S-Adenosylmethioninsynthetasen sind maßgeblich an der Ethylenproduktion beteiligt. Ethylen besitzt eine Funktion in der Weiterleitung des hypoxischen Signals, in der Bildung von Aerenchymen und adventiven Wurzeln sowie in der Induzierung des für Alkoholdehydrogenase kodierenden Gens bei Hypoxie (Steffens und Sauter, 2010; Wang et al., 2002; Liu et al., 2005; Lorbiecke und Sauter, 1999). Eventuelle Zusammenhänge zwischen der Regulierung von MAT2 und MAT3 durch Hypoxie und der Produktion von Ethylen müssten durch weiterführende Experimente untersucht werden.

4.10.2 Unter hypoxischen Bedingungen vermindert vorkommende Proteine

4.10.2.1 MPP α (α -Untereinheit der mitochondrialen prozessierenden Peptidase)

Mitochondriale prozessierende Peptidasen (MPPs) stellen heterodimere Metalloproteasen der Pitrilysin-Familie dar (Braun und Schmitz, 1997). Sie entfernen die N-terminale Präsequenz von Proteinen der mitochondrialen Matrix nach dem Import. Die α -Untereinheit ist für die Erkennung der Präsequenz und die Peptidbindung verantwortlich, während die β -Untereinheit die Hydrolyse katalysiert (Mukhopadhyay et al., 2002; Oshima et al., 2005). Für eine korrekte Funktion dieses Holoenzym werden beide Untereinheiten benötigt (Braun und Schmitz, 1997). Mitochondrial lokalisierte Proteine besitzen unterschiedliche Präsequenzen. MPP ist als einzige bekannte Protease an der Entfernung all dieser Sequenzen beteiligt. Sie ist daher

ein wichtiger Bestandteil des generellen mitochondrialen Importmechanismus. Bei Säugern und Hefen ist dieses Protein in der mitochondrialen Matrix lokalisiert, während es bei Pflanzen eine Komponente des membrangebundenen Cytochrom-bc₁-Komplexes darstellt (Glaser et al., 1998; Murcha et al., 2004). Der Import der Trägermoleküle wird durch Sauerstoffmangel nicht beeinträchtigt, während der generelle Importweg unter anaeroben Bedingungen eine geringere Kapazität besitzt (Howell et al., 2007). Untersuchungen des mitochondrialen Proteoms von *O. sativa* unter Anoxie zeigten für viele Komponenten des generellen Importweges keine Beeinflussung der Transkriptraten. Dies weist auf eine posttranskriptionelle Regulierung hin (Howell et al., 2007). Die Herunterregulierung der beiden MPP-Untereinheiten findet dagegen sowohl auf Transkript- als auch auf Proteinebene statt (Howell et al., 2007). Die Importrate des generellen Mechanismus korreliert mit der Menge an MPP. Je weniger MPP vorhanden ist, umso weniger Proteine werden importiert (Howell et al., 2007). Die Kapazität des generellen Importweges ist daher möglicherweise von der Menge an MPP α und MPP β abhängig. Daher könnte MPP unter Umständen diese Form des Proteinimports regulieren. Die geringere Beeinflussung des Imports von Trägerproteinen wäre damit zu erklären, dass diese keine abspaltbare Präsequenz besitzen und daher nicht von MPP prozessiert werden müssen (Howell et al., 2007). Für eudikotyledone Pflanzen wurden derartige Analysen bisher nicht durchgeführt. In *A. thaliana* wird MPP α von zwei Genen kodiert (At1g51980, At3g16480; Meyer et al., 2008). Die in dieser Arbeit identifizierte von At3g16480 kodierte Isoform kommt im mitochondrialen Proteom unter hypoxischen Bedingungen weniger häufig vor als bei Normoxie (siehe 3.5.2). Die Transkriptrate des Gens wird durch Hypoxie nicht beeinflusst (Branco-Price et al., 2005; Branco-Price et al., 2008; diese Arbeit). Daher regulieren in *A. thaliana* bei Hypoxie möglicherweise hauptsächlich posttranskriptionelle Mechanismen das Vorkommen dieser Isoform von MPP α . Beide Untereinheiten von MPP verfügen über eine N-terminale Präsequenz. Da die mitochondriale prozessierende Peptidase in *A. thaliana* zusätzlich zur Entfernung der Präsequenz eine Funktion im Proteinimport besitzt (Glaser et al., 1998; Lister et al., 2004), ist sie sozusagen an ihrem eigenen Import beteiligt (Braun und Schmitz, 1997). Somit wäre sie möglicherweise auch zur Regulierung ihres Vorkommens in der Lage. MPP ist darüber hinaus Teil des Komplex III. Dieser stellt insbesondere bei Inhibierung der Cytochrom-c-Oxidase durch NO unter hypoxischen Bedingungen eine Hauptproduktionsstätte von ROS in der mitochondrialen Atmungskette dar (Rhoads et al., 2006; Blokhina und Fagerstedt, 2010). Eine durch ROS ausgelöste Unterbrechung dieses Komplexes könnte daher eventuell zu einer Störung des Proteinimports durch MPP führen. Dies würde das verringerte Vorkommen von MPP α bei

Hypoxie trotz fehlender Regulierung auf Transkriptebene erklären. Ein reduziertes Vorkommen von MPP α könnte möglicherweise dazu führen, dass weniger zu importierende Proteine erkannt und gebunden werden. Dies hätte einen verzögerten Importmechanismus zur Folge und damit Einfluss auf das Vorkommen an mitochondrialen Proteinen. Daher könnte MPP α eine Funktion bei der Regulierung der Menge an mitochondrialen Proteinen in *A. thaliana* unter hypoxischen Bedingungen besitzen. Zur genauen Untersuchung einer möglichen Funktion von MPP bei der Regulierung des mitochondrialen Proteinvorkommens wären gezielte Studien des Proteinimports unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen notwendig, die eine Untersuchung der Transkriptrate der zu importierenden Proteine mit einbeziehen. Eine diesbezügliche Analyse von T-DNA-Insertionsmutanten der für MPP α und MPP β kodierenden Gene könnte weiterhin helfen, die Rolle von MPP im mitochondrialen Proteinimport bei Hypoxie aufzuklären.

4.10.2.2 TUA2-4 (Tubulin-alpha-2-alpha-4-Kette)

Das 50, 12 kDa große Protein TUA2-4 (At1g50010, At1g04820) stellt einen Bestandteil von Tubulin dar. Dieses aus globulären α -, β - und γ -Untereinheiten aufgebaute heterodimere Protein kommt in der Zelle als Gemisch von Polypeptiden vor (Smertenko et al., 1997). Tubuline lagern sich zu Mikrotubuli genannten helikalen Hohlkörpern zusammen. Diese universellen intrazellulären Strukturen sind als Bestandteile des Cytoskeletts an der Separierung der Chromosomen, der Zellbewegung, intrazellulären Transportprozessen, der räumlichen Organisation von Zellen sowie deren Morphogenese beteiligt (Kirik et al., 2002). Das Genom von *A. thaliana* enthält sechs für α -Tubulin (*TUA1* bis *TUA6*), neun für β -Tubulin (*TUB1* bis *TUB9*) und zwei für γ -Tubulin kodierende Gene (Snustad et al., 1992; Kopczak et al., 1992; Liu et al., 1994). Die in dieser Arbeit untersuchte Isoform des Proteins TUA2-4 wird von *TUA4* (At1g04820) kodiert. Das Gen wird in der gesamten Pflanze exprimiert (siehe 3.5.4). Bioinformatische und massenspektrometrische Untersuchungen weisen auf eine Lokalisation in der Plasmamembran, in der Zellwand, in den Chloroplasten und im Cytosol hin (de la Fuente van Bentem et al., 2008; Benschop et al., 2007; Bayer et al., 2006; Kleffmann et al., 2004). Verlagerung und Bewegung der Mitochondrien in der Zelle wird von cytoskelettalen Kräften verursacht (van Gestel et al., 2002). Mitochondrien innerhalb der Cytoplasmastränge sind extrem beweglich (Logan und Leaver, 2000). Die ATP-abhängige Bewegung findet entlang von Aktinfilamenten statt (van Gestel et al., 2002). Zusätzlich

kommen Mitochondrien über Mikrotubuli in der Plasmamembran verankert im kortikalen Cytoplasma vor (Mao et al., 2005; van Gestel et al., 2002). Aus diesem Grund könnte TUA2-4 eventuell mitochondrial assoziiert sein. Das verminderte Vorkommen bei Hypoxie könnte unter Umständen durch Depolymerisierung und Abbau der kortikalen Mikrotubuli hervorgerufen werden. Dies kann durch Seneszenz, biotischen oder abiotischen Stress verursacht werden (Keech et al., 2010; Keech, 2011). Auslöser ist unter anderem ein auch bei hypoxischen Bedingungen vorkommender Anstieg des cytosolischen Kalziumgehalts (Lecourieux et al., 2002; Subbaiah et al., 1998). Da sich Mitochondrien bei oxidativem Stress und Hypoxie neu anordnen (Yoshinaga et al., 2005a; Scott und Logan, 2008; Zhang und Xing, 2008), könnte hier eventuell ein Zusammenhang bestehen. Die Degradierung der Mikrotubuli geht mit einer verminderten Expression der entsprechenden Gene einher (van der Graaf et al., 2006), was auch unter hypoxischen Bedingungen bei dem Gen *TUA4* zu beobachten war (siehe 3.5.4). Um das Verhalten und die Funktion von kortikalen Mikrotubuli bei Hypoxie genauer zu analysieren, bietet sich eine Untersuchung der Zusammensetzung und Depolymerisierungsrate an. Eine mögliche mitochondriale Assoziation des Proteins TUA2-4 könnte mit Reportergenkonstrukten untersucht werden.

4.10.2.3 PDIL2-1 (Proteindisulfidisomerase)

Das 29, 54 kDa große Enzym PDIL2-1 (At2g47470) gehört zur Familie der Proteindisulfidisomerasen (PDIs). Diese Enzyme katalysieren die Ausbildung, Reduzierung oder Isomerisierung von Disulfidbrücken. PDIs agieren daher als molekulare Chaperone von sezernierten Proteinen oder Bestandteilen der Plasmamembran (Wilkinson und Gilbert, 2004; Houston et al., 2005). Mitochondriale PDIs regulieren möglicherweise die Membrandurchlässigkeit (Rigobello et al., 2000). *A. thaliana* besitzt 22 für Proteindisulfidisomerasen kodierende Gene (Houston et al., 2005). PDIL2-1 ist im Endoplasmatischen Retikulum (ER) sowie in der Plasmamembran lokalisiert und besitzt kein ER-Rückhaltesignal (Wang et al., 2008; Jaquinod et al., 2007; Lu und Christopher, 2008). ER und Mitochondrien können assoziiert sein (de Brito und Scorrano, 2010). Dies könnte eine mögliche Erklärung für das beobachtete Vorkommen von PDIL2-1 im mitochondrialen Gesamtprotein darstellen. PDIL2-1 ist wahrscheinlich an der Reifung und korrekten Faltung von sekretorischen Proteinen oder Proteinen der Plasmamembran beteiligt (Wang et al., 2008). *Gain of function*-Mutationen führen zu einer verzögerten Reife des Embryosacks und einem fehlgerichteten

Pollenschlauchwachstum (Wang et al., 2008). Unter hypoxischen Bedingungen kommt PDIL2-1 mit einer geringeren Häufigkeit vor (siehe 3.5.3). Ein vermindertes Vorkommen von Proteindisulfidisomerasen führt unter Umständen zur Auslösung des programmierten Zelltods (Hashida et al., 2011). Dies ist auch bei oxidativem Stress der Fall (Wang et al., 2007), welcher ebenfalls bei Hypoxie auftritt (Rhoads et al., 2006). Da *PDIL2-1* in der gesamten Pflanze exprimiert wird (siehe 3.5.4), könnte möglicherweise zwischen dem verminderten Vorkommen und der durch Hypoxie ausgelösten Apoptose ein Zusammenhang bestehen. Zur Überprüfung dieser Hypothese sind allerdings weitere Untersuchungen nötig.

4.11 Beeinflussung der Entwicklung und Morphologie von Wildtyp-Pflanzen und T-DNA-Insertionsmutanten durch Hypoxie

Die kleinen mitochondrialen Hitzeschockproteine ATSP26.3-mito, ATHSP22-mito, die kalziumabhängigen Proteinkinasen CPK22 und CPK23 sowie das stomatinartige mitochondriale Protein ATSLP-mito stellen hypoxiebeeinflusste Proteine dar. Eine Untersuchung des Phänotyps von homozygoten *knock-down* T-DNA-Insertionsmutanten der Linien *cpk22* und *atslp-mito* sowie homozygoten *knock-out* T-DNA-Insertionsmutanten der Linien *athsp26.3-mito*, *athsp22-mito* und *cpk23* weist auf mögliche Funktionen der entsprechenden Proteine im Wachstums- und Reproduktionsprozess hin, die im Folgenden näher erläutert werden.

4.11.1 Verzögerung des vegetativen Wachstums und der Reproduktion von *Arabidopsis thaliana* durch Hypoxie

Die viertägige Überflutung 14 Tage alter Pflanzen hatte bei allen Linien ein gegenüber der Kontrolle verlangsamtes vegetatives Wachstum, eine geringere Größe sowie eine verminderte Anzahl an sekundären Infloreszenzen zur Folge (siehe 3.6.3). Geflutete Wildtyp-Pflanzen bildeten im Vergleich zur Kontrolle später Blüten und Schoten und besaßen einen reduzierten Anteil an fertilem Pollen, Schoten und Samen. Die Ausprägung dieser Merkmale war bei gefluteten T-DNA-Insertionsmutanten von der jeweiligen Linie abhängig. Hypoxie hat einen

reduzierten Energiestatus der Zelle zur Folge (Geigenberger, 2003). Gärprozesse verursachen eine längerfristig giftige Azidifizierung des Cytoplasmas sowie einen Verlust von Kohlenstoff (Rocha et al., 2010). Die Reoxygenisierung des Gewebes führt durch Bildung von ROS zu peroxidativen Schäden (Biemelt et al., 1998). Aus diesen Gründen könnte Sauerstoffmangel die Entwicklung verzögern. Abiotischer Stress löst vorzeitige Blattseneszenz aus (Lim et al., 2007). Die Zellbestandteile seneszenten Blätter werden in exportierbare Nährstoffe umgewandelt, mit denen sich entwickelnde Samen oder andere im sich im Wachstum befindende Organe der Pflanze versorgt werden (Lim et al., 2007). Im Fall von Überflutung könnte so eventuell ein Notblühprogramm initiiert werden, bei dem die gefluteten Pflanzen aufgrund einer möglichst schnellen Fortpflanzung kleinere vegetative Organe ausbilden. Umweltbedingter Stress reduziert weiterhin die Fruchtbarkeit vieler Pflanzen (Sun et al., 2004; Hauser et al., 2005). Dies könnte eine Erklärung für die verminderte Anzahl an sekundären Infloreszenzen bei den gefluteten Pflanzen darstellen. Die Bildung von Pollen verbraucht viel Energie (Lee und Warmke, 1997). Aufgrund der fehlenden photosynthetischen Aktivität sich entwickelnder Pollenkörner wird diese ausschließlich von den Mitochondrien bereitgestellt (De Paepe et al., 1993). Eine durch Hypoxie ausgelöste mitochondriale Dysfunktion könnte sich daher unter Umständen negativ auf die Pollenentwicklung auswirken. Ebenso resultiert bei *A. thaliana* ein Großteil der verminderten Fertilität aus dem verfrühten Absterben der Samen (Sun et al., 2004; Hauser et al., 2005). Bei limitierten Ressourcen führt ein selektiver Abort von Samen mit geringer Qualität zu verbesserten Überlebenschancen der übrigen Embryonen. Die Pflanze verwendet in diesem Fall die vorhandenen Vorräte zur Produktion von wenigen Samen mit hoher Qualität (Melser und Klinkhamer, 2001). Dies würde sowohl die geringe Schotenanzahl als auch die verminderte Produktion von vitalen Samen erklären.

4.11.2 Entwicklung und Reproduktion von Pflanzen der Linien

athsp22-mito* und *athsp26.3-mito

ATHSP26.3-mito (At1g52560) und ATHSP22-mito (At5g51440) stellen wie schon unter 4.3.1.1 erwähnt zwei Vertreter der drei bisher bekannten mitochondrial lokalisierten kleinen Hitzeschockproteine in *A. thaliana* dar, deren Gene bei hypoxischem Stress vermehrt exprimiert werden (siehe 3.2.1.2). Pflanzen der Linien *athsp26.3-mito* und *athsp22-mito* bildeten vermehrt laterale Wurzeln und Wurzelhaare (siehe 3.6.2). Sie zeigten gegenüber

Wildtyp-Pflanzen eine beschleunigte Entwicklung und Reproduktion (siehe 3.6.3). Die Seitentriebe von Pflanzen der Linien *athsp22-mito* und *athsp26.3-mito* wiesen Anzeichen von Epinastie auf (siehe 3.6.3.4). Außerdem produzierten Pflanzen dieser Linien weniger vitalen Pollen und weniger morphologisch normal ausgebildete Samen als Wildtyp-Pflanzen. Unbefruchtete Samenanlagen wurden ebenfalls beobachtet (siehe 3.6.3.7 und 3.6.3.11). Diese Merkmale können durch ROS verursacht werden. So fördert ein vermehrtes Vorkommen von ROS und Ca^{2+} -Ionen die Ausbildung von Wurzeln und Wurzelhaaren (Foreman et al., 2003; Dunand und Penel, 2007). Aufgrund ihrer Beteiligung an der Steuerung des Übergangs zur Blütenbildung, der Seneszenz der Blüte und der Fruchtreife führen erhöhte Raten an ROS zu Seneszenz, einer frühen Blüte und Epinastie (Woo et al., 2004; Ye et al., 2000; Jimenez et al., 2002; Tripathi und Tuteja, 2007; Balazadeh et al., 2011; Kotchoni et al., 2009; Pazmiño et al., 2011). Oxidativer Stress vermindert weiterhin die Fertilität des Pollens, beeinträchtigt die Embryoentwicklung und führt zu einem vorzeitigen Absterben der Samen (Hu et al., 2011; Zinn et al., 2010; Young et al., 2004; Suzuki und Mittler, 2006). Pflanzliche mitochondriale kleine Hitzeschockproteine sind an der Stabilisierung des Komplex I der Atmungskette beteiligt und eventuell zur Neutralisierung von ROS in der Lage (Hamilton und Heckathorn, 2001; Sun et al., 2002). Eine Fehlfunktion von ATHSP26.3-mito oder ATHSP22-mito könnte daher unter Umständen eine Destabilisierung mitochondrialer Proteine zur Folge haben. Eine durch fehlerhafte Proteinfaltung hervorgerufene mitochondriale Dysfunktion führt zum vermehrten Ausstoß von ROS (Ryan und Hoogenraad, 2007). Dies könnte eine mögliche Ursache für den Phänotyp der Linien *athsp26.3-mito* und *athsp22-mito* darstellen. Mittels mitochondrialer retrograder Regulierung könnte auf diese Weise ein Notblühprogramm zur möglichst schnellen Reproduktion initiiert werden. Da ROS die Biosynthese, den Transport, die Verteilung sowie die oxidative Degradierung und Konjugation von Auxin beeinflussen und außerdem Cytokinin oxidieren können (Tognetti et al., 2011; Gidrol et al., 1994), könnte eine vermehrte Produktion von mitochondrialen ROS eventuell die Homöostase von Auxin und Cytokinin im Apikalmeristem verändern. Dies könnte sich unter Umständen auf die Differenzierung der dortigen Stammzellen auswirken und so die epinastischen Seitentriebe verursachen. Geblutete Pflanzen wiesen im Vergleich zur Kontrolle einen reduzierten Anteil an fertilem Pollen auf (siehe 3.6.3.7). Sie bildeten außerdem später und weniger Schoten (siehe 3.6.3.9 und 3.6.3.10). Sauerstoffmangel verursacht eine Inhibierung der Atmungskette, was eine verstärkte ROS- und eine verminderte ATP-Produktion zur Folge hat (Rhoads et al., 2006; Igamberdiev und Hill, 2009). Eine Reoxygenierung führt ebenfalls zur vermehrten Bildung von ROS (Biemelt et al., 1998). Dies könnte unter Umständen die durch Fehlfunktion

von ATHSP26.3-mito und ATHSP22-mito hervorgerufenen Auswirkungen verstärken und so den Phänotyp der gefluteten Pflanzen verursachen.

Die mitochondrialen kleinen Hitzeschockproteine ATHSP26.3-mito und ATHSP22-mito sind unter Umständen an der Stabilisierung mitochondrialer Proteine und der Neutralisierung von ROS beteiligt (Hamilton und Heckathorn, 2001; Sun et al., 2002). Zur Untersuchung ihrer genauen Funktionsweise wäre zusätzlich zu den unter 4.3.1.1 genannten Vorschlägen eine Identifizierung möglicher Bindungspartner sinnvoll. Da das Ausschalten von *ATHSP26.3-mito* oder *ATHSP22-mito* die Transkriptrate des jeweils anderen Gens beeinflusst (siehe 3.2.1.4), könnten anhand von Doppel-*knock-out*-Mutanten weitere Hinweise auf eine mögliche funktionelle Redundanz oder gegenseitige Wechselwirkungen der entsprechenden Proteine erhalten werden. Außerdem bietet sich eine Messung des Auxin- und Cytokiningehalts sowie den Anteil an mitochondrialen ROS bei Pflanzen der Linien *athsp26.3-mito* und *athsp22-mito* an. Eine Untersuchung des Pollenschlauchwachstums sowie der Embryonen könnte die Ursache der reduzierten Fertilität und vorzeitig abgestorbenen Samen identifizieren. Dies könnte unter Umständen zur Aufklärung der Funktion der drei kleinen mitochondrialen Hitzeschockproteine unter hypoxischen Bedingungen und ihres eventuellen Einflusses auf die mitochondriale retrograde Signaltransduktion beitragen.

4.11.3 Entwicklung und Reproduktion von Pflanzen der Linien *cpk22* und *cpk23*

Die kalziumabhängigen Proteinkinasen Proteinen CPK22 und CPK23 stellen wie schon unter 4.8 erwähnt effektive Schalter für die Transduktion von Kalziumsignalen in Pflanzen dar. Sie sind möglicherweise an der mitochondrialen retrograden Regulierung beteiligt. Die entsprechenden Gene werden unter hypoxischen Bedingungen verstärkt exprimiert (siehe 3.3.2).

4.11.3.1 Wachstum und Entwicklung

Pflanzen der Linie *cpk22* zeigten gegenüber Wildtyp-Pflanzen eine beschleunigte Entwicklung und Reproduktion sowie einen verlängerten Haupttrieb (siehe 3.6.3). Bei den Seitentrieben wurden Anzeichen von Epinastie beobachtet (siehe 3.6.3.4). Epinastie kann

durch eine erhöhte Ethylenproduktion verursacht werden (Kazemi und Kefford, 1974). Die kalziumabhängige Proteinkinase CPK22 könnte aufgrund ihrer cytoplasmatischen Lokalisation und ihrer Fähigkeit zur Weiterleitung von Kalziumsignalen möglicherweise eine Rolle in der mitochondrialen retrograden Signaltransduktion spielen. Ein durch T-DNA-Insertion hervorgerufener *knock-down* von CPK22 könnte daher unter Umständen die mitochondriale Proteinzusammensetzung beeinflussen und eventuell eine Dysfunktion dieser Organellen zur Folge haben. Dies kann zu einem vermehrten Ausstoß von ROS führen (Ryan und Hoogenraad, 2007). Da ROS mit ethylenabhängigen Signalen interagieren (Overmyer et al., 2003), könnte ein *knock-down* von CPK22 unter Umständen dieses Merkmal verursachen. H₂O₂ fördert darüber hinaus die Synthese von Gibberellin (Liu et al., 2010). Dieses Phytohormon ist für das Längenwachstum des Sprosses verantwortlich, unterstützt die Transition vom juvenilen zum adulten Blatt (Hooley, 1994; Fleet und Sun, 2005) und fördert Blütenbildung und Reproduktion (Langridge, 1957; Domagalska et al., 2010, Hooley, 1994; Davinder et al., 2010; Arnaud et al., 2010; Radi et al., 2006). In *Oriza sativa* und *Nicotiana tabacum* sind kalziumabhängige Proteinkinasen an der durch Gibberellin ausgelösten Signaltransduktion beteiligt (Abo-El-Saad und Wu, 1995; Ishida et al., 2008). Daher kann ein Einfluss von CPK22 auf diesen Vorgang in *A. thaliana* nicht ausgeschlossen werden. Ein vermindertes Vorkommen dieses Proteins könnte unter Umständen den Gehalt an Gibberellin oder die Signaltransduktion dieses Phytohormons beeinflussen und auf diese Weise den Phänotyp der Linie *cpk22* verursachen.

Pflanzen der Linie *cpk23* wiesen eine geringere Anzahl an gekeimten Samen als der Wildtyp auf (siehe 3.6.2). Die Keimung setzte sechs Tage später als bei Wildtyp-Pflanzen ein (siehe 3.6.3.1). Weiterhin wurde eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Hypoxie in Verbindung mit einem reduzierten Längenwachstum beobachtet (siehe 3.6.2). Ein Mangel an lateralen Wurzeln trat ebenfalls auf (siehe 3.6.2). Geblutete Pflanzen der Linie *cpk23* entwickelten und reproduzierten sich schneller als geblutete Wildtyp-Pflanzen (siehe 3.6.3). Anzahl und Größe der Blätter waren beim Übergang zur Blütenbildung reduziert. Die Blätter zeigten Anzeichen von Seneszenz (siehe 3.6.3.3). Des Weiteren traten auch bei dieser Linie epinastische Seitentriebe auf (siehe 3.6.3.4). Diese Vorgänge und Merkmale können durch ein vermehrtes Vorkommen von Abscisinsäure hervorgerufen werden. So ist dieses Phytohormon an der Aufrechterhaltung der Samenruhe beteiligt (Zeevaart und Creelman, 1988; Hubbard et al., 2010). In Verbindung mit Hypoxie löst es möglicherweise eine zweite Samenruhe aus (Benech-Arnold et al., 2006; Fei et al., 2007; Smit et al., 1990; Neuman und Smit, 1991). Weiterhin induzieren Abscisinsäure und Hypoxie die verstärkte Bildung von ROS (Pei et al.,

2000; Mustilli et al., 2002; Suhita et al., 2004; Rhoads et al., 2006; Igamberdiev und Hill, 2009). Abscisinsäure hemmt außerdem das laterale Wurzelwachstum und verzögert bei ungünstigen Umweltbedingungen Wachstum und Entwicklung von Keimlingen (De Smet et al., 2003; Shkolnik-Inbar und Dudy Bar-Zvi, 2010; Finkelstein et al., 2002; Lopez-Molina et al., 2001).. Ein sehr hoher Gehalt dieses Phytohormons fördert eventuell eine verfrühte Blütenbildung sowie Fruchtreife (Domagalska et al., 2010; Chai et al., 2011). Ebenso ruft die Applizierung von Abscisinsäure bei Blättern Epinastie hervor (Dwyer et al., 1995). Die kalziumabhängige Proteinkinase CPK23 interagiert mit Serin-Threonin-Phosphatasen vom Typ 2C (PP2C) (Geiger et al., 2010), die als negative Regulatoren der abscisinsäureabhängigen Signaltransduktion wirken (Ma et al., 2009; Park et al., 2009). Aus diesem Grund könnte eine Fehlfunktion dieses Proteins eine vermehrte Produktion von Abscisinsäure oder ein dementsprechendes Signal zur Folge haben und so den Phänotyp der Linie *cpk23* verursachen. Die Anzahl an lateralen Wurzeln war bei begasten Pflanzen der Linie *cpk23* gegenüber der Kontrolle reduziert (siehe 3.6.2). Da sich Sauerstoffmangel negativ auf das Wurzelwachstum auswirkt (van Dongen et al., 2009), könnte eventuell die Kombination von Hypoxie und einer Störung der abscisinsäureabhängigen Signaltransduktion dafür verantwortlich sein.

4.11.3.2 Mögliche Ursachen für die bei Überflutung geöffneten Stomata von Pflanzen der Linie *cpk23*

Ein besonderes Merkmal der Linie *cpk23* waren die auch bei Dunkelheit und Überflutung vermehrt geöffneten Stomata (siehe 3.6.3.2). Für Pflanzen dieser Linie sind in der Literatur unterschiedliche Phänotypen bezüglich der Stomataöffnung beschrieben. So wurden gegenüber dem Wildtyp verkleinerte Stomataöffnungen beobachtet, die trotzdem noch auf den Wechsel von Licht und Dunkelheit reagieren (Ma und Wu, 2007). In einer weiteren Veröffentlichung wiesen die Pflanzen keinen Unterschied zum Wildtyp auf (Geiger et al., 2010). Aufgrund der Verwendung derselben T-DNA-Insertionsmutante (SALK_007958) in allen drei Untersuchungen kann eine Linienspezifität ausgeschlossen werden. Die Apertur der Stomata wurde bei Ma und Wu anhand der Blattepidermis bestimmt. Da die Reaktion der Schließzellen auf Überflutung von Signalen aus dem Mesophyll abhängt (Sibbersen und Mott, 2010), wurde in dieser Arbeit ein Abdruck der Blattunterseite verwendet. Daher sind die unterschiedlichen Ergebnisse möglicherweise auf die Untersuchungsmethoden

zurückzuführen. Überflutung hat eine Schließung der Stomata zur Folge (Pezeshki et al., 1996a; Mao et al., 2005; Sibbersen und Mott, 2010). An diesem Vorgang ist ein durch Abscisinsäure übertragenes Signal beteiligt (Jia und Zhang, 2008; Suhita et al., 2003; Suhita et al., 2004). Für die Signaltransduktion dieses Phytohormons werden ROS und Ca^{2+} -Ionen benötigt (Suhita et al., 2003; Jia und Zhang, 2008). Die Aktivierung von Anionenkanälen durch Abscisinsäure in den Schließzellen erfolgt auf zwei verschiedenen Wegen. Während einer dieser Vorgänge Ca^{2+} -unabhängig ist (Marten et al., 2007), ist der andere Signalweg mit Veränderungen der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration assoziiert (Hetherington und Woodward, 2003; Hetherington und Brownlee, 2004). Die beiden Signalwege konvergieren auf der Stufe des SLAC1-Anionenkanals unter Kontrolle des ABI1/ABA-Rezeptorkomplexes (Geiger et al., 2010). Die Verknüpfung von kalziumabhängigen mit abscisinsäureabhängigen Signalwegen geschieht durch Serin-Threonin-Phosphatasen vom Typ 2C (PP2C). Diese agieren als negative Regulatoren der abscisinsäureabhängigen Signaltransduktion und stellen Interaktionspartner von CPK23 dar (Ma et al., 2009; Park et al., 2009; Joshi-Saha et al., 2011; Geiger et al., 2010). Da Mitochondrien unter hypoxischem Stress Kalziumionen ausstoßen (Subbaiah et al., 1998), könnte CPK23 eventuell an der Weiterleitung des Hypoxiesignals an die Schließzellen beteiligt sein. Eine Unterbrechung dieses Signals durch eine Fehlfunktion von CPK23 hätte unter Umständen eine Störung des Schließmechanismus zur Folge. Die voneinander abweichenden Beobachtungen zur Öffnung der Stomata (Ma und Wu, 2007; Geiger et al., 2010; diese Arbeit) könnten möglicherweise auch auf eine unterschiedlich starke Kompensation von CPK23 durch den CPK21-abhängigen Signalweg zurückzuführen sein, da das Ausschalten von *CPK23* die Transkriptrate von *CPK21* erhöht (Geiger et al., 2010). Die Kompensationsrate und damit der Öffnungsgrad der Stomata könnte unter Umständen durch die jeweiligen Umweltbedingungen bestimmt werden. So weisen Pflanzen der Linie *cpk23* bei Salz- und Trockenheitsstress eine verstärkte K^+ -Aufnahme und verminderte Transpiration auf, was zu einer erhöhten Toleranz gegenüber diesen abiotischen Stressformen führt (Ma und Wu, 2007). Die nach Überflutung beobachtete Öffnung der Stomata scheint dagegen für die Toleranz von Pflanzen der Linie *cpk23* gegenüber Hypoxie nicht von Bedeutung zu sein, da geflutete Pflanzen der Linie *cpk23* zwölf Tage nach der Behandlung keinen Unterschied zum Wildtyp zeigten (siehe 3.6.3.3).

4.11.3.3 Möglicher Zusammenhang von Pollenvitalität, Hypoxie und Grad der Blütendeformation

Pflanzen der Linien *cpk22* und *cpk23* besaßen zwei bezüglich ihrer Morphologie unterschiedliche Blütenformen (siehe 3.6.3.6). Neben normal ausgebildeten Blüten wurden Blüten mit verkürzten Filamenten sowie unterschiedlich großen Sepalen und Petalen beobachtet. Ein *knock-down* bzw. *knock-out* von CPK22 oder CPK23 könnte möglicherweise durch Störungen der retrograden Regulierung die Funktion der Mitochondrien beeinträchtigen. Eine mitochondriale Dysfunktion beeinflusst im Blütengewebe von *A. thaliana* die Signaltransduktion von Auxin, Ethylen und Abscisinsäure. Kohlenstoff- und Lipidstoffwechsel sowie Respiration, Proteinsynthese und Zellwandaufbau sind ebenfalls betroffen (Busi et al., 2011). In cytoplasmatisch männlich sterilen somatischen Hybriden von *A. thaliana* und *Brassica napus* wirken sich Störungen der mitochondrialen retrograden Regulierung negativ auf die Größe von Karpellen, Petalen und Stamen aus (Teixeira et al., 2005). Ähnliches Ursachen könnten unter Umständen für den Phänotyp von Blüten der Linien *cpk22* und *cpk23* verantwortlich sein. Weiterhin wurde bei Pflanzen der Linie *cpk22* und *cpk23* eine gegenüber dem Wildtyp reduzierte Anzahl an vitalem Pollen beobachtet (siehe 3.6.3.7). Deformierte Blüten der Linie *cpk22* produzierten weniger vitalen Pollen als normale Blüten. Zwischen der Kontrolle und den gefluteten Pflanzen bestand kein Unterschied. Hypoxie besitzt bei Pflanzen dieser Linie daher vermutlich keinen Einfluss auf die Pollenvitalität. Das mitochondriale Proteom des Pollens unterscheidet sich in seiner Zusammensetzung von dem des vegetativen Gewebes. Zahlreiche nukleär kodierte mitochondriale Polypeptide werden nur im Pollen synthetisiert und sind für dessen Entwicklung essentiell (De Paepe et al., 1993; Li et al., 2010). Störungen der mitochondrialen retrograden Regulierung beeinträchtigen daher die Produktion von fertilem Pollen bis hin zur männlichen Sterilität (Busi et al., 2011; Teixeira et al., 2005; Carlsson et al., 2008). Ein *knock-down* von CPK22 könnte eventuell durch Beeinträchtigung der mitochondrialen retrograden Signaltransduktion den reduzierten Anteil an fertilem Pollen bei Pflanzen der Linie *cpk22* verursachen. Bei Pflanzen der Linie *cpk23* war der Anteil an vitalem Pollen bei gefluteten Pflanzen reduziert, während die Blütenmorphologie keinen Einfluss auf die Fertilität des Pollens besaß (siehe 3.6.3.7). Eine Fehlfunktion von CPK23 könnte unter Umständen eine erhöhte Konzentration von Abscisinsäure oder eine dementsprechende Störung der Signaltransduktion zur Folge haben. Hypoxie verursacht ebenfalls erhöhte Konzentrationen dieses Phytohormons (Benech-Arnold et al., 2006; Fei et al., 2007; Smit et

al., 1990; Neuman und Smit, 1991). Ein Überschuss an Abscisinsäure führt bei *Oriza sativa* und *Triticum aestivum* zu einer Veränderung der Pollenmorphologie (Morgan, 1980; Oliver et al., 2007). Daher könnte bei gefluteten Pflanzen eine mögliche durch Hypoxie und Fehlfunktion von CPK23 erhöhte Konzentration an Abscisinsäure in Kombination mit einer eventuellen Störung der mitochondrialen retrograden Regulierung unter Umständen für die reduzierte Pollenvitalität verantwortlich sein.

4.11.3.4 Reduzierte Samenanzahl

Pflanzen der Linien *cpk22* und *cpk23* besaßen in der Kontrolle weniger normal ausgebildete Samen pro Schote als Wildtyp-Pflanzen (siehe 3.6.3.11). Weiterhin traten vorzeitig abgestorbene Samen und unbefruchtete Samenanlagen auf. Die Ausprägung dieser Merkmale unterschied sich bei einzelnen Schoten zum Teil stark und ist vermutlich auf die Unterschiede in der Blütenmorphologie zurückzuführen. Die unbefruchteten Samenanlagen sind unter Umständen eine Folge der verminderten Pollenvitalität. Weiterhin können verkürzte Filamente, wie sie auch bei Blüten der Linien *cpk22* und *cpk23* beobachtet wurden, die Samenanzahl reduzieren, da die Antheren das Stigma nicht erreichen (Leino et al., 2004). Eine mitochondriale Dysfunktion führt zur vermehrten Produktion von ROS (Rhoads und Subbaiah., 2006). Oxidativer Stress beeinträchtigt die Embryoentwicklung und führt zu einem vorzeitigen Absterben der Samen (Hu et al., 2011; Zinn et al., 2010; Young et al., 2004; Suzuki und Mittler, 2006). Sollte durch ein *knock-down* bzw. *knock-out* der kalziumabhängigen Proteinkinasen CPK22 und CPK23 eine Störung der mitochondrialen retrograden Regulierung verursacht werden, so könnte dies eine weitere Erklärung für die verminderte Samenanzahl darstellen.

Die kalziumabhängigen Proteinkinasen CPK22 und CPK23 könnten möglicherweise eine Funktion in der mitochondrialen retrograden Regulierung besitzen. CPK23 ist unter Umständen an der negativen Regulierung der abscisinsäureabhängigen Signaltransduktion beteiligt (Geiger et al., 2010). Eine eventuelle Beteiligung von CPK22 an der gibberellinabhängigen Signaltransduktion kann nicht ausgeschlossen werden. Zur Überprüfung dieser Hypothesen müsste der Gehalt dieser Phytohormone mittels Gaschromatographie in Pflanzen der Linien *cpk22* und *cpk23* bestimmt werden. Zusätzlich zu den unter 4.10 aufgeführten Vorschlägen bietet sich eine Bestimmung der ROS-Konzentration in Pflanzen der Linien *cpk22* und *cpk23* an. Durch eine Fusion der Promotoren von CPK22

und *CPK23* mit einem geeigneten Reportergen könnte die Gewebespezifität und Stärke der Expression bei Hypoxie in der Pflanze ermittelt werden. Eine Untersuchung der Expression von weiteren an gibberellin- oder abscisinsäureabhängigen Signalwegen beteiligten Genen könnte näheren Aufschluss über die Funktion von *CPK22* und *CPK23* in der Signaltransduktionskette geben. Da kalziumabhängige Proteinkinasen das gerichtete Wachstum des Pollenschlauchs regulieren (Myers et al., 2009), könnte eine Analyse der Pollenkeimung unter Umständen die genaue Ursache für die erhöhte Anzahl an unbefruchteten Samenanlagen bei Pflanzen der Linien *cpk22* und *cpk23* aufklären. Durch eine Untersuchung der Samen ließe sich eventuell der Grund für das vorzeitige Absterben finden.

4.11.4 Entwicklung und Reproduktion von Pflanzen der Linie *atslp-mito*

A. thaliana verfügt über zwei mitochondrial lokalisierte Stomatine (Scheible et al., 2003; Heazlewood et al., 2003), von denen das in dieser Arbeit identifizierte Homolog ATSLP-mito (At4g27585) unter hypoxischen Bedingungen vermehrt vorkommt (siehe 3.5.3). Stomatine sind in Pflanzen möglicherweise an der Regulierung von Kationenkanälen sowie an der Stabilisierung von Prohibitinen und Komplexen der Atmungskette beteiligt (Nadimpalli et al., 2000). Pflanzen der Linie *atslp-mito* zeigten verglichen mit dem Wildtyp eine geringere Anzahl an gekeimten Samen (siehe 3.6.2). Sie entwickelten sich langsamer und reproduzierten sich später (siehe 3.6.3). Blüten dieser Linie besaßen in der Kontrolle zum Teil verkürzte Petalen und Filamente (siehe 3.6.3.6). Vereinzelt wurden vollständig fehlende Stamen beobachtet. Bei gefluteten Pflanzen wiesen alle Blüten diese Fehlbildungen auf. Der Anteil an vitalem Pollen war bei normal ausgebildeten Blüten der Kontrolle größer als bei deformierten Blüten und gefluteten Pflanzen (siehe 3.6.3.7). Die Anzahl an morphologisch normal ausgebildeten Samen pro Schote war geringer als bei Wildtyp-Pflanzen (siehe 3.6.3.11). Weiterhin traten vorzeitig abgestorbene Samen sowie unbefruchtete Samenanlagen auf. Bei gefluteten Pflanzen der Linie *atslp-mito* wurden vereinzelt parthenokarpische Schoten beobachtet. Diese Merkmale lassen sich durch eine mögliche mitochondriale Dysfunktion erklären. Für Keimung, Entwicklung, Ausbildung der floralen Organe, Pollenvitalität und Embryoentwicklung sind einwandfrei funktionierende Mitochondrien besonders essentiell. So stellen diese Organellen während der Quellung und Keimung von Samen vermehrt ATP für den Aufschluss von Speicherstoffen bereit, da der Embryo in dieser Phase noch nicht fähig zur Photosynthese ist (Saisho et al., 2001; Linka et al., 2008). Das

Ausschalten der Gene von mitochondrialen zur Familie der Prohibitine gehörenden integralen Membranproteinen verzögert die Entwicklung der Pflanze (van Aken et al., 2007). Ein reduziertes Membranpotential, eine verminderte ATP-Produktion sowie eine verstärkte Bildung von mitochondrialen ROS führen zu einer verstärkten Expression von an der Auxin- und Abscisinsäuresignaltransduktion und -verteilung beteiligten Genen (Busi et al., 2011). Für eine korrekte Ausbildung der floralen Organe ist eine genau ausbalancierte Verteilung von Auxin notwendig. Störungen haben deformierte Blüten zur Folge (Krizek, 2011). Da sich entwickelnde Pollenkörner nicht photosynthetisch aktiv sind, wird die zur Pollenbildung nötige Energie ausschließlich von den Mitochondrien bereitgestellt (De Paepe et al., 1993). Aus diesem Grund besitzen Antheren und Pollenkörner eine größere Anzahl an Mitochondrien als andere pflanzliche Zelltypen (Lee und Warmke, 1979). Eine Dysfunktion der Mitochondrien hat daher eine gravierende Beeinträchtigung der Pollenentwicklung zur Folge (Hanson und Bentolila, 2004). Um den hohen Energiebedarf des Embryos zu decken, besitzen dessen Zellen eine größere Anzahl an Mitochondrien (Rigas et al., 2009). Eine Akkumulation von ROS sowie ein Verlust des mitochondrialen Membranpotentials kann daher zur Einleitung des programmierten Zelltods und somit zum verfrühten Absterben von Samen führen (Sun et al., 2004; Hauser et al., 2005; Yao et al., 2004).

Stomatine sind in Pflanzen möglicherweise an der Stabilisierung von Prohibitinen und Komplexen der Atmungskette oder an der Regulierung mitochondrialer Kaliumkanäle beteiligt (Nadimpalli et al., 2000). Ein *knock-down* des stomatinartigen Proteins ATSLP-mito könnte daher unter Umständen die Integrität der Mitochondrien stören und so den Phänotyp der Linie *atslp-mito* verursachen. Zur Überprüfung dieser Hypothese wäre eine Identifizierung von möglichen Interaktionspartnern sinnvoll. Zusätzlich zu den unter 4.7.1.1 erwähnten Vorschlägen wäre eine Analyse des Pollenschlauchwachstums zur Überprüfung der Keimfähigkeit sinnvoll. Weiterhin bietet sich eine Analyse der Samen an, um den Grund für die geringe Größe und das vorzeitige Absterben zu finden.

5 Zusammenfassung

Hypoxie beeinflusst Wachstum und Entwicklung von Pflanzen. Da Sauerstoff als finaler Elektronenakzeptor der Atmungskette dient, sind Mitochondrien möglicherweise an der Wahrnehmung von Hypoxie und der Weiterleitung des Signals durch retrograde Regulierung beteiligt. In dieser Arbeit wurden daher die Auswirkungen von Hypoxie auf das Transkriptom und das mitochondriale Proteom von *Arabidopsis thaliana* untersucht. Zu diesem Zweck wurden Inkubationssysteme für Zellkulturen, Keimlinge und Pflanzen etabliert. Mittels bioinformatischen Methoden, quantitativer Real Time PCR, GFP-Fusionsanalysen und einer Untersuchung des mitochondrialen Proteoms wurden 16 hypoxiebeeinflusste nukleär kodierte möglicherweise mitochondrial lokalisierte oder assoziierte Proteine identifiziert. Bei diesen handelt es sich um drei kleine Hitzeschockproteine (ATHSP26.3-mito, ATHSP23.6-mito, ATHSP22-mito), das calmodulinartige Protein CML38, eine putative Helikase (PHL), den Zinkfinger-Transkriptionsfaktor ATIDD14, die Isoform 1a der Alternativen Oxidase (AOX1a), die Tubulin-alpha-2-alpha-4-Kette (TUA2-4), die Proteindisulfidisomerase PDIL2-1, das stomatinartige Protein ATSLP-mito, die Glutathion-S-Transferase 6 (ATGSTF6), eine Triosephosphatisomerase (ATCTIMC), eine 2,3-biphosphoglyceratunabhängige Phosphoglyceratmutase (ATPGAM-i-cyto), die Oxidoreduktase ATB2, die α -Untereinheit der mitochondrialen prozessierenden Peptidase (MPP α) sowie ein Bindungspartner (BPA1) des am Sphingolipidtransport beteiligten Proteins ACD11. Eine Charakterisierung der beiden hypoxiebeeinflussten kalziumabhängigen Proteinkinasen CPK22 und CPK23 lässt auf eine mögliche Beteiligung an der mitochondrialen retrograden Signaltransduktion schließen. Hypoxie führt zu *Oxidative Bursts*, einer verlangsamten Bewegung und Vereinzelung der Mitochondrien sowie zu einer Auflösung ihrer Struktur. Bei Wildtyp-Pflanzen und T-DNA-Insertionsmutanten der Linien *cpk22*, *cpk23*, *athsp26.3-mito*, *athsp22-mito* und *atslp-mito* wurden Wachstum, Entwicklung und Reproduktion beeinträchtigt. Pflanzen der Linien *cpk23* und *atslp-mito* zeigten eine verminderte Anzahl gekeimter Samen. Pflanzen der Linie *cpk23* besaßen eine von Überflutung und Dunkelheit unabhängige erhöhte Anzahl an geöffneten Stomata. Pflanzen der Linien *athp26.3-mito*, *athsp22-mito*, *cpk22* und *cpk23* entwickelten und reproduzierten sich schneller, Pflanzen der Linie *atslp-mito* langsamer als Wildtyp-Pflanzen. Bei Pflanzen der Linien *cpk22*, *cpk23* und *atslp-mito* traten deformierte Blüten auf. Alle T-DNA-Insertionsmutanten zeigten eine reduzierte Pollenvitalität und Samenanzahl sowie unbefruchtete Samenanlagen und deformierte Samen. Somit beeinflussen die entsprechenden Proteine Wachstum, Entwicklung und Reproduktion. Zur Charakterisierung der genauen Funktion im Zusammenhang mit Hypoxie sind jedoch weitere Untersuchungen nötig.

Summary

Hypoxia severely affects plant growth and development. Due to the function of oxygen as final electron acceptor in the respiratory chain, mitochondria might play an important role in hypoxia sensing and signal transduction via retrograde regulation. In order to unravel the influence of oxygen deprivation on the transcriptome and mitochondrial proteome of *Arabidopsis thaliana*, adequate incubation systems for cell cultures, seedlings and plants have been developed. Hypoxia apparently causes oxidative bursts, slows down mitochondrial movement in the cytoplasm and leads to separation and shrinking of those organelles followed by structural disintegration. Applied bioinformatics, quantitative real time PCR, GFP fusion protein experiments and an analysis of the mitochondrial proteome resulted in the identification of 16 hypoxia-regulated proteins. Three small heat shock proteins (ATHSP26.3-mito, ATHSP23.6-mito, ATHSP22-mito), Alternative Oxidase isoform 1a (AOX1a), a putative helicase (PHL), a calmodulin-like protein (CML38), a zinc finger transcription factor (ATIDD14), the tubulin- α -2- α -4-chain (TUA2-4), the protein disulfide isomerase PDIL2-1, a stomatin-like protein (ATSLP-mito), glutathione-S-transferase 6 (ATGSTF6), a triose phosphate isomerase (ATCTIMC), a 2,3-biphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase (ATPGAM-i-cyto), an oxidoreductase (ATB2), mitochondrial processing peptidase α -subunit (MPP α) and a binding partner (BPA1) of the sphingolipid transfer associated protein ACD11 were nuclear encoded but apparently mitochondrial located or associated. Furthermore, hypoxia-influenced calcium dependent protein kinases CPK22 and CPK23 were characterized in detail. Results approve a possible function in mitochondrial retrograde signal transduction. Hypoxia severely affected growth, development and reproduction in wild type plants and homozygous T-DNA insertion mutants *cpk22*, *cpk23*, *athsp26.3-mito*, *athsp22-mito* und *atslp-mito*. *Cpk23* and *atslp-mito* mutants showed a reduced number of germinated seeds. *Cpk23* mutants possessed an elevated number of permanently opened stomata neither affected by flooding nor darkness. *Athsp26.3-mito*, *athsp22-mito*, *cpk22* and *cpk23* mutants developed and reproduced faster than wild type plants, while this process was delayed in *atslp-mito* mutants. *Cpk22*, *cpk23* and *atslp-mito* mutants also showed flower deformations. Pollen fertility and seed number was reduced in all T-DNA insertion mutants. Unfertilized ovules and deformed seeds were also observed. Altogether, these proteins clearly influence growth, development and reproduction. Further investigations are needed to elucidate and characterize the detailed function of those proteins according to hypoxia.

6 Literaturverzeichnis

- Abo-El-Saad, M., Wu, R. (1995) A rice membrane calcium-dependent protein kinase is induced by gibberellin. *Plant Physiol* **108**, 787-793.
- Alexander, M. P. (1969) Differential staining of aborted and nonaborted pollen. *Stain Technol* **44** (8), 117-122.
- Aloni, R., Schwalm, K., Langhans, M., Ullrich, C. I. (2003) Gradual shifts in sites of free-auxin production during leaf-primordium development and their role in vascular differentiation and leaf morphogenesis in *Arabidopsis*. *Planta* **216**, 841-853.
- Alonso, J. M., Stepanova, A. N., Leisse, T. J., Kim, C. J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D. K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C. C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D. E., Marchand, T., Risseuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W. L., Berry, C. C., Ecker, J. R. (2003) Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**(5633), 653-657.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) "Basic local alignment search tool." *J Mol Biol* **215**, 403-410.
- Anderson, L. E. (1971) Chloroplast and cytoplasmic enzymes. II. Pea leaf triose phosphat isomerases. *Biochim Biophys Acta* **235** (1), 237-244.
- Arimura, S., Aida, G. P., Fujimoto, M., Nakazono, M., Tsutsumi, N. (2004) *Arabidopsis* dynamin-like protein 2a (ADL2a), like ADL2b, is involved in plant mitochondrial division. *Plant Cell Physiol* **45** (2), 236-242.
- Arnaud, N., Girin, T., Sorefan, K., Fuentes, S., Wood, T. A., Lawrenson, T., Sablowski, R., Østergaard, L. (2010) Gibberellins control fruit patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev* **24** (19), 2127-2132.
- Bailey-Serres, J., Chang, R. (2005) Sensing and signalling in response to oxygen deprivation in plants and other organisms. *Ann Bot* **96**, 507-518.
- Balazadeh, S., Kwasniewski, M., Caldana, C., Mehrnia, M., Zanol, M. I., Xue, G., Mueller-Roeber, B. (2011) ORS1, an H₂O₂-responsive NAC transcription factor, controls senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant* **4** (2), 346-360.
- Banerjee, S., Goswami, R. (2010) GST profile expression study in some selected plants: *in silico* approach. *Mol Cell Biochem* **336**, 109-126.
- Banti, V., Loreti, E., Novi, G., Sant Aniello, A., Alpi, A., Perata, P. (2008) Heat acclimation and cross-tolerance against anoxia in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ* **31**, 1029-1037.
- Barth, C., Jander, G. (2006) *Arabidopsis* myrosinases TGG1 and TGG2 have redundant function in glucosinolate breakdown and insect defense. *Plant J* **46**, 549-562.

- Bayer, E. M., Bottrill, A. R., Walshaw, J., Vigouroux, M., Naldrett, M. J., Thomas, C., L. (2006) *Arabidopsis* cell wall proteome defined using multidimensional protein identification technology. *Proteomics* **6** (1), 301-311.
- Baxter-Burrell, A., Yang, Z., Springer, P. S., Bailey-Serres, J. (2002) RopGAP4-dependent Rop GTPase rheostat control of *Arabidopsis* oxygen deprivation tolerance. *Science* **296**, 2026-2028.
- Beck, E., Ludwig, G., Auerswald, E. A., Reiss, B., Schaller, H. (1982) Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. *Gene* **19**, 327-336.
- Benech-Arnold, R. L., Gualano, N., Leymarie, J., Côme, D., Corbineau, F. (2006) Hypoxia interferes with ABA metabolism and increases ABA sensitivity in embryos of dormant barley grains. *J Exp Bot* **57** (6), 1423-1430.
- Benschop, J. J., Mohammed, S., O'Flaherty, M., Heck, A. J. R., Slijper, M., Menke, F. L. H. (2007) Quantitative phosphoproteomics of early elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Mol Cell Proteomics* **6** (7), 1198-1214.
- Berkelman, T., Sennstedt, T. (1998) 2-D-Electrophoresis using immobilized pH-gradients. Principles and Methods. Amersham Biosciences.
- Berry, E. A., Huang, L., DeRose, V. J. (1991) Ubiquinol-cytochrome *c* oxidoreductase of higher plants. *J Biol Chem* **26** (15), 9064-9077.
- Bi, Y., Chen, W., Zhang, W., Zhou, Q., Yun, L., Xing, D. (2009) Production of reactive oxygen species, impairment of photosynthetic function and dynamic changes in mitochondria are early events in cadmium-induced cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Biol Cell* **101**, 629-643.
- Biemelt, S., Keetman, U., Albrecht, G. (1998) Re-aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. *Plant Physiol* **116**, 651-658.
- Binder, S., Marchfelder, A., Brennicke, A. (1996) Regulation of gene expression in plant mitochondria. *Plant Mol Biol* **32**, 303-314.
- Binschedler, L. V., Palmblad, M., Cramer, R. (2008) Hydroponic isotope labelling of entire plants (HILEP) for quantitative plant proteomics; an oxidative stress case study. *Phytochemistry* **69**, 1962-1972.
- Blokhina, O., Fagerstedt, K. V. (2010) Reactive oxygen species and nitric oxide in plant mitochondria: origin and redundant regulatory systems. *Physiol Plant* **138**, 447-462.
- Bochmann, M. L., Sabouri, N., Zakian, V. A., (2010) Unwinding the functions of the Pif1 family helicases. *DNA Repair* **9**, 237-249.
- Bohne, A. V., Ruf, S., Börner, T., Bock, R. (2007) Faithful transcription initiation from a mitochondrial promoter in transgenic plastids. *Nucl Acids Res* **35**, Onlineveröffentlichung.

- Bolle, N., Hinrichsen, I., Kempken, F. (2007) Plastid mRNAs are neither spliced nor edited in maize and cauliflower mitochondrial in organello systems. *RNA* **13**, 2061-2065.
- Bolwell, P. G., butt, V. S., Davies, D. R., Zimmerlin, A. (1995) The origin of oxidative bursts in plants. *Free Rad Res* **23** (6), 517-532.
- Bonen, L. (2008) Cis- and trans-splicing of group II introns in plant mitochondria. *Mitochondrion* **8**, 26-34.
- Borisjuk, L., Macherel, D., Benamar, A., Wobus, U., Rolletschek, H. (2007) Low oxygen sensing and balancing in plant seeds: a role for nitric oxide. *New Phytol* **176**, 813-823.
- Borisjuk, L., Rolletschek, H. (2008) Nitric oxide is a versatile sensor of low oxygen stress in plants. *Plant Signal Behav* **3** (6), 391-393.
- Borner, G. H. H., Sherrier, J. D., Weimar, T., Michaelson, L. V., Hawkins, N. D., MacAskill, A., Napier, J. A., Beale, M. H., Lilley, K. S., Dupree, P. (2005) Analysis of detergent-resistant membranes in *Arabidopsis*. Evidence for plasma membrane lipid rafts. *Plant Physiol* **137**, 105-116.
- Borovkov, A. Y., Rivkin, M. I. (1997) XcmI-containing vector for direct cloning of PCR products. *Biotechniques* **22** (5), 812-814.
- Bossi, F., Cordoba, E., Dupré, P., Mendoza, M. S., San Román, C., León, P. (2009) The *Arabidopsis* ABA-INSENSITIVE (ABI) 4 factor acts as a central transcription activator of the expression of its own gene, and for the induction of ABI5 and SBE2.2 genes during sugar signaling. *Plant J* **59**, 359-374.
- Botrel, A., Magne, C., Kaiser, W. M. (1996) Nitrate reduction, nitrite reduction and ammonium assimilation in barley roots in response to anoxia. *Plant Physiol Biochem* **34**, 645-652.
- Bouché, N., Yellin, A., Snedden, W. A., Fromm, H. (2005) Plant-specific calmodulin-binding proteins. *Annu Rev Plant Biol* **56**, 435-466.
- Boulé, J. B., Zakian, V. A. (2006) Roles of Pif1-like helicases in the maintenance of genomic stability. *Nucleic Acids Res* **34** (15), 4147-4153.
- Boulé, J. B., Zakian, V. A. (2007) The yeast Pif1p DNA helicase preferentially unwinds RNA-DNA substrates. *Nucleic Acids Res* **35** (17), 5809-5818.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Brahimi-Horn, C. M., Pouysségur, J. (2007) Oxygen, a source of life and stress. *FEBS Lett* **581**, 3582-3591.
- Branco-Price, C., Kawaguchi, R., Ferreira, R. B., Bailey-Serres, J. (2005) Genome-wide analysis of transcript abundance and translation in *Arabidopsis* seedlings subjected to oxygen deprivation. *Ann Bot* **96**, 647-660.

- Branco-Price, C., Kaiser, K. A., Jang, C. J. H., Larive, C. K., Bailey-Serres, J. (2008) Selective mRNA translation coordinates energetic and metabolic adjustments to cellular oxygen deprivation and reoxygenation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **56** (5), 743-755.
- Braun, H. P., Schmitz, U. K. (1997) The mitochondrial processing peptidase. *Int J Biochem Mol Biol* **29** (8/9), 1043-1045.
- Braun, H. P., Schmitz, U. K. (1999) The protein-import apparatus of plant mitochondria. *Planta* **209**, 267-274.
- Brennicke, A., Grohmann, L., Hiesel, R., Knoop, V., Schuster, W. (1993) The mitochondrial genome on its way to the nucleus: different stages of gene transfer in higher plants. *FEBS Lett* **325**, 140-145.
- Brodersen, P., Petersen, M., Pike, H. M., Olszak, B., Skov, S., Ødum, N., Jørgensen, L. B., Brown, R. E., Mundy, J. (2001) Knockout of *Arabidopsis ACCELERATED-CELL-DEATH1* encoding a sphingosine transfer protein causes activation of programmed cell death and defense. *Genes Dev* **16**, 490-502.
- Brown, G. C. (1995) Nitric oxide regulates mitochondrial respiration and cell functions by inhibiting cytochrome oxidase. *FEBS Lett* **369**, 136-139.
- Bruhs, A., Kempken, F. (2011) RNA editing in plant mitochondria. In: Kempken, F. (ed) *Plant Mitochondria*, Springer Verlag, New York, Dordrecht, Heidelberg, London, 157-176.
- Bullock, W., Fernandez, J., Short, J. (1987) XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* **5**, 376-378.
- Bunn, H. F., Poyton, R. O. (1996) Oxygen sensing and molecular adaption to hypoxia. *Physiol Rev* **76**, 839-885.
- Busi, M. V., Gomez-Lobato, M. E., Rius, S. P., Turowski, V. R., Casati, P., Zabaleta, E. J., Gomez-Casati, D. F., Araya, A. (2011) Effect of mitochondrial dysfunction on carbon metabolism and gene expression in flower tissues of *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant* **4** (1), 127-143.
- Cao, D., Cheng, H., Wu, W., Soo, H. M., Peng, J. (2006) Gibberellin mobilizes distinct DELLA-dependent transcriptomes to regulate seed germination and floral development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **142** (2), 509-525.
- Carlsson, J., Leino, M., Sohlberg, J., Sundström, J. F., Glimelius, K. (2008) Mitochondrial regulation of flower development. *Mitochondrion* **8**, 74-86.
- Carrie, C., Kühn, K., Murcha, M. W., Duncan, O., Small, I.D., O'Toole, N., Whelan, J. (2009) Approaches to defining dual-targeted proteins in *Arabidopsis*. *Plant J* **57** (6), 1128-1139.
- Caspers, G. J., Leunissen, J. A., de Jong, W. W. (1995) The expanding small heat-shock protein family, and structure predictions of the conserved "alpha-crystallin domain". *J Mol Evol* **40**, 238-248.

- Chai, Y., Jia, H., Dong, Q., Shen, S. (2011) FaPYR1 is involved in strawberry fruit ripening. *J Exp Bot*, Onlineveröffentlichung.
- Chen, M. und Thelen, J. J. (2010) The plastid isoform of triose phosphate isomerase is required for the postgerminative transition from heterotrophic to autotrophic growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, Preview.
- Chen, W., Provart, N.J., Glazebrook, J., Katagiri, F., Chang, H.S., Eulgem, T., Mauch, F., Luan, S., Zou, G., Whitham, S.A., Budworth, P.R., Tao, Y., Xie, Z., Chen, X., Lam, S., Kreps, J.A., Harper, J.F., Si-Ammour, A., Mauch-Mani, B., Heinlein, M., Kobayashi, K., Hohn, T., Dangl, J.L., Wang, X., Zhu, T. (2002) Expression profile matrix of *Arabidopsis* transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. *Plant Cell* **14**, 559-574.
- Cheng, S. H., Willmann, M.R., Chen, H.C., Sheen, J. (2002) Calcium signaling through protein kinases. The *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase gene family. *Plant Physiol* **129**, 469-485.
- Cheng, Z., Sattler, S., Maeda, H., Sakuragi, Y., Bryant, D. A., DellaPenna, D. (2003) Highly divergent methyltransferases catalyze a conserved reaction in tocopherol and plastoquinone synthesis in cyanobacteria and photosynthetic eukaryotes. *Plant Cell* **15**, 2343-2356.
- Chivasa, S., Ndimba, B. K., Simon, W. J., Lindsey, K., Slabasc, A. R. (2005) Extracellular ATP functions as an endogenous external metabolite regulating plant cell viability. *Plant Cell* **17**, 3019-3034.
- Choquet, Y., Wollman, F. A. (2002) Translational regulations as specific traits of chloroplast gene expression. *FEBS Lett* **529**, 39-42.
- Christensen, A. C., Lyznik, A., Mohammed, S., Elowsky, C. G., Elo, A., Yule, R., Mackenzie, S. A. (2005) Dual-domain, dual-targeting organellar protein presequences in *Arabidopsis* can use non-AUG start codons. *Plant Cell* **17**, 2805-2816.
- Claros, M., Vincens, P. (1996) Computational method to predict mitochondrially-imported proteins and their targeting sequences. *Eur J Biochem* **241**, 779-786.
- Clifton, R., Lister, R., Parker, K. L., Sappl, P. G., Elhafez, D., Millar, A. H., Day, D. A., Whelan, J. (2005) Stress-induced co-expression of alternative respiratory chain components in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **58**, 192-212.
- Clifton, R., Millar, A. H., Whelan, J. (2006) Alternative oxidases in *Arabidopsis*: A comparative analysis of differential expression in the gene family provides new insights into function of non-phosphorylating bypasses. *Biochim Biophys Acta* **1657**, 730-741.
- Clough, S. J. (2005) Floral dip: *Agrobacterium*-mediated germ line transformation. *Methods of Molecular Biology* **286**, 91-102.
- Colasanti, J., Yuan, Z., Sundaresan, V. (1998) The indeterminate gene encodes a zinc finger protein and regulates a leaf-generated signal required for the transition to flowering in maize. *Cell Press* **93** (4), 491-494.

- Colasanti, J., Tremblay, R., Wong, A. Y. M., Coneva, V., Kozaki, A., Mable, B. K. (2006) The maize *INDETERMINATE1* flowering time regulator defines a highly conserved zinc finger protein family in higher plants. *BMC Genomics* **7**, 1-17.
- Cooper, C. E. (2002) Nitric oxide and cytochrome oxidase: substrate, inhibitor or effector? *Trends Biochem Sci* **27**, 33-39.
- Cruz de Carvalho, M. H. (2008) Drought stress and reactive oxygen species. *Plant Signal Behav* **3** (3), 156-165.
- Curtis, M. J., Wolpert, T. J. (2002) The oat mitochondrial permeability transition and its implication in victorin binding and induced cell death. *Plant J* **29** (3), 295- 312.
- Da Cruz, S., Parone, P. A., Ponzalo, P., Bienvenut, W. V., Tondera, D., Jourdain, A., Quadroni, M., Martinou, J.-C. (2008) SLP-2 interacts with prohibitins in the mitochondrial inner membrane and contributes to their stability. *Biochim Biophys Acta* **1783**, 904-911.
- Damman, C., Ichida, A., Hong, B., Romanowsky, S. M., Hrabak, E. M., Harmon, A. C., Pickard, B. G., Harper, J. F. (2003) Subcellular targeting of nine calcium-dependent protein kinase isoforms from *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **132**, 1840-1848.
- Das, R., Pandey, G. K., (2010) Expressional analysis and role of calcium regulated kinases in abiotic stress signaling. *Curr Genomics* **11**, 2-13.
- Davinder, S. P., Jermakow, A. M., Swain, S. M. (2002) Gibberellins are required for seed development and pollen tube growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14**, 3133-3147.
- Day, I. S., Reddy, V. S., Ali, G. S., Reddy, A. S. N. (2002) Analysis of EF-hand-containing proteins in *Arabidopsis*. *Genome Biol* **3** (10), Onlineveröffentlichung.
- De Jong, W. W., Caspers, G. J., Leunissen, J. A. (1998) Genealogy of the alpha-crystallin-small heat-shock protein superfamily. *Int J Biol Macromol* **22**, 151-162.
- De la Fuente van Bentem, S., Anrather, D., Dohnal, I., Roitnger, E., Csazaer, E., Joore, J., Buijnik, J., Carreri, A., Forzani, C., Lorkovic, Z. J., Barta, A., Lecourieux, D., Verhounig, A., Jonak, C., Hirt, H. (2008) Site-specific phosphorylation profiling of *Arabidopsis* proteins by mass spectrometry and peptide chip analysis. *J Proteome Res* **7**, 2458-2470.
- Delledone, M., Xia, Y., Dixon, R. A., Lamb, C. (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394**, 585-588.
- De Brito, O. M., Scorrano, L. (2010) An intimate liaison: spatial organization of the endoplasmic reticulum-mitochondria relationship. *EMBO J* **29** (16), 2715-2723.
- De Longevialle, A. F., Small, I. D., Lurin, C. (2010) Nuclearly encoded splicing factors implicated in RNA splicing in higher plant organelles. *Mol Plant* **3** (4), 691-705.
- De Paepe, R., Forchioni, A., Chétrit, P., Vedel, F. (1993) Specific mitochondrial proteins in pollen: Presence of an additional ATP synthase β - subunit. *PNAS* **90**, 5934-5938.

- De Smet, I., Signora, L., Beeckman, T., Inzé, D., Foyer, C. H., Zhang, H. (2003) Absciscic acid-sensitive checkpoint in lateral root development of *Arabidopsis*. *Plant J.* **33**, 543-555.
- Dietz, K. J., Vogel, M. O., Viehhauser, A. (2010) AP2/EREBP transcription factors are part of gene regulatory networks and integrate metabolic, hormonal and environmental signals in stress acclimation and retrograde signalling. *Protoplasma* **245**, 3-14.
- Domagalska, M. A., Sarnowska, E., Nagy, F., Davies, S. J. (2010) Genetic analyses of interactions among gibberellin, abscisic acid, and brassinosteroids in the control of flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *PloS* **5** (11), Onlineveröffentlichung.
- Doudican, N. A., Song, B., Shadel, G. S., Doetsch, P. W. (2005) Oxidative DNA damage causes mitochondrial genomic instability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **25** (12), 5196-5204.
- Downs, C. A., Heckathorn, S. A. (1998) The mitochondrial small heat-shock protein protects NADH:ubiquinone oxidoreductase of the electron transport chain during heat stress in plants. *FEBS Lett* **430**, 246-250.
- Duchen, M. R. (2000) Mitochondria and Ca^{2+} in cell physiology and pathophysiology. *Cell Calcium* **28**, 339-348.
- Duchêne, A. M., and Maréchal-Drouard, L. (2001) The chloroplast derived trnW and trnM-e genes are not expressed in *Arabidopsis* mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* **285**, 1213-1216.
- Dunand, C., Penel, C. (2007) Localization of superoxide in the root apex of *Arabidopsis*. *Plant Signal Behav* **2** (2), 131-132.
- Duncan, M. W., Roder, H., Hunsucker, S. W. (2008) Quantitative matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Brief Funct Genomic Proteomic* **7** (5), 355-370.
- Dwyer, P. J., Bannister, P., Jameson, P. E. (1995) Effects of three plant growth regulators on growth, morphology, water relations, and frost resistance in lemonwood (*Pittosporum eugenoides* A. Cunn). *NZ J Bot* **33**, 415-424.
- Edwards, R., Dixon, D. P., Walbot, V. (2000) Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends Pla Sci*, **5** (5), 193-198.
- El-Maarouf-Bouteau, H., Bailly, C. (2008) Oxidative signaling in seed germination and dormancy. *Plant Signal Behav* **3** (3), 175-182.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S., von Heijne, G. (2000) Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol* **300**, 1005-1016.
- Endres, M. W., Gregory, B. D., Gai, Z., Foreman, A. W., Mlotshwa, S., Ge, X., Pruss, G. J., Ecker, J. R., Bowman, L. H., Vance, V. (2010) Two plant viral suppressors of silencing require the ethylene-inducible host transcription factor RAV2 to block RNA silencing. *PLoS Pathog* **6** (1), 1-12.

- Englbrecht, C. C., Schoof, H., Böhm, S. (2004) Conservation, diversification and expansion of C2H2 zinc finger proteins in the *Arabidopsis thaliana* genome. *BMC Genomics* **5** (39), 1-17.
- Escobar, M. A., Keara, A., Franklin, A., Svensson, S., Salter, M. G., Whitlam, G. C., Rasmusson, A. G. (2004) Light regulation of the *Arabidopsis* respiratory chain. Multiple discrete photoreceptor responses contribute to induction of type II NAD(P)H dehydrogenase genes. *Plant Physiol* **136**, 2710-2721.
- Escobar, M. A., Geisler, D. A., Rasmusson, A. G. (2006) Reorganization of the alternative pathways of the *Arabidopsis* respiratory chain by nitrogen supply: opposing effects of ammonium and nitrate. *Plant J* **45**, 775-788.
- Esterházy, D., King, M. S., Yakovlev, G., Hirst, J. (2008) Production of reactive oxygen species by complex I (NADH:UbiquinoneOxidoreductase) from *Escherichia coli* and comparison to the enzyme from mitochondria. *Biochemistry* **47**, 3964-3971.
- Eudes, A., Mouille, G., Thévenin, J., Goyallon, A., Minic, Z., Jouanin, L. (2008) Purification, cloning and functional characterization of an endogenous beta-glucuronidase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **49** (9), 1331-1341.
- Fannjiang, Y., Cheng, W., Lee, S. J., Qi, B., Pevsner, J., McCaffery, J. M., Hill, R. B., Basañez, G., Hardwick, J. M. (2004) Mitochondrial fission proteins regulate programmed cell death in yeast. *Genes Dev* **18**, 2785-2795.
- Fei, H., Tsang, E., Cutler, A. J. (2007) Gene expression during seed maturation in *Brassica napus* in relation to the induction of secondary dormancy. *Genomics* **89**, 419 – 428.
- Feissner, R. F., Skalska, J., Gaum, W. E., Sheu, S. S. (2009) Crosstalk signaling between mitochondrial Ca²⁺ and ROS. *Front Biosci* **14**, 1197-1218.
- Finkelstein, R. R., Gampala, S. S. L., Rock, C. D. (2002) Absciscic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell Suppl* 2002, 15-45.
- Fleet, C. M., Sun, T. (2005) A DELLAcate balance: the role of gibberellin in plant morphogenesis. *Curr Opin Plant Biol* **8** (1), 77-85.
- Foreman, J., Demidchik, V., Bothwell, J. H. F., Mylona, P., Miedema, H., Torresk, M. A., Linstead, P., Costa, S., Brownlee, C., Jonesk, J. D. G., Davies, J. M., Dolan, L. (2003) Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* **422**, 442-446.
- Foyer, C. H., Noctor, G. (2003) Redox sensing and signaling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiol Plant* **119**, 355-364.
- Frazier, A. E., Kiu, C., Stojanovski, D., Hoogenraas, N. J., Ryan, M. T. (2006) Mitochondrial morphology and distribution in mammalian cells. *Biol Chem.* **387** (12), 1551-1558.

- Fujimoto, M., Arimura, S., Mano, S., Kondo, M., Saito, C., Ueda, T., Nakazono, M., Nakano, A., Nishimura, M., Tsutsumi, N. (2009) *Arabidopsis* dynamin-related proteins DRP3A and DRP3B are functionally redundant in mitochondrial fission, but have distinct roles in peroxisomal fission. *Plant J* **58**, 388-400.
- Gabaldón, T., Sneh, B., van Zimmeren, F., Hemrika, W., Tabak, H., Huynen, M. A. (2006) Origin and evolution of the peroxisomal proteome. *Biol Direct* **1** (8), 1-14.
- Gabaldón, T., Huynen, M. A. (2007) From endosymbiont to host-controlled organelle: The hijacking of mitochondrial protein synthesis and metabolism. *PLoS Comput Biol* **3** (11), e219.
- Gagliardi, D., Binder, S. (2007) Expression of the plant mitochondrial genome. *Annual Plant Reviews Volume 31: Plant Mitochondria* (ed D. C. Logan), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 51-96.
- Garnier, L., Simon-Plas, F., Thuleau, P., Agnel, J. P., Blein, J. P., Ranjeva, R., Montillet, J. L. (2006) Cadmium affects tobacco cells by a series of three waves of reactive oxygen species that contribute to cytotoxicity. *Plant Cell Environ* **29**, 1956-1969.
- Geigenberger, P. (2003) Response of plant metabolism to too little oxygen. *Curr Opin Plant Biol* **6**, 247-256.
- Geiger, D., Scherzer, S., Mumm, P., Marten, I., Ache, P., Matschi, S., Wellmann, C., Al-Rasheid, K. A., Grill, E., Romeis, T., Hedrich, R. (2010) Guard cell anion channel SLAC1 is regulated by CDPK protein kinases with distinct Ca^{2+} affinities. *Proc Natl Acad Sci USA* **107** (17), 8023-8028.
- Gidrol, X., Lin, W. S., Degousseé, N., Yip, S. F., Kush, A. (1994) Accumulation of reactive oxygen species and oxidation of cytokinin in germinating soybean seeds. *Eur J Biochem* **224**, 21-28.
- Giegé, P., Hoffmann, M., Binder, S., and Brennicke, A. (2000). RNA degradation buffers asymmetries of transcription in *Arabidopsis* mitochondria. *EMBO Rep* **1**, 164-170.
- Giegé, P., Heazlewood, J. L., Roessner-Tunali, U., Millar, A. H., Fernie, A. R., Leaver, C. J., Sweetlove, L. J. (2003) Enzymes of glycolysis are functionally associated with the mitochondrion in *Arabidopsis* cells. *Plant Cell* **15**, 2140-2151.
- Giegé, P., Sweetlove, L. J., Cognat, V., Leaver, C. J. (2005) Coordination of nuclear and mitochondrial genome expression during mitochondrial biogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **17**, 1497-1512.
- Gill, S. S., Tuteja, N. (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem* **48**, 909-930.
- Giraud, E., Ho, L. H. M., Clifton, R., Carrol, A., Estavillo, G., Tan, Y. F., Howell, K. A., Ivanova, A., Pogson, B. J., Millar, A. H., Whelan, J. (2008) The absence of ALTERNATIVE OXIDASE1a in *Arabidopsis* results in acute sensitivity to combined light and drought stress. *Plant Physiol* **147**, 595-610.

- Giraud, E., Van Aken, O., Ho, L. H. M., Whelan, J. (2009) The transcription factor ABI4 Is a regulator of mitochondrial retrograde expression of ALTERNATIVE OXIDASE 1a. *Plant Physiol* **150**, 1286-1296.
- Glaser, E., Sjöling, S., Tanudji, M., Whelan, J. (1998) Mitochondrial protein import in plants. *Plant Mol Biol* **38** (1 – 2), 311-338.
- Graham, J. W. A., Williams, T. C. R., Morgan, M., Fernie, A. R., Ratcliffe, R. G., Sweetlove, L. J. (2007) Glycolytic enzymes associate dynamically with mitochondria in response to respiratory demand and support substrate channeling. *Plant Cell* **19**, 3723-3738.
- Graña, X., Ureña, J., Ludevid, D., Carreras, J., Climent, F. (1989) Purification, characterization and immunological properties of 2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase from maize (*Zea mays*) seeds. *Eur J Biochem* **186** (1-2), 149-153.
- Gray, M. W. (1992) The endosymbiont hypothesis revisited. *Int Rev Cytol* **141**, 233-257
- Gray, M. W. (1999) Evolution of organellar genomes. *Curr Opin Genet Dev* **9**, 678-687.
- Gray, M. W., Burger, G., Lang, F. B. (1999) Mitochondrial evolution. *Science* **283**, 1476-1481.
- Grobei, M. A., Qeli, E., Brunner, E., Rehrauer, H., Zhang, R., Roschitzki, B., Basler, K., Ahrens, C. H., Grossniklaus, U. (2009) Deterministic protein inference for shotgun proteomics data provides new insights into *Arabidopsis* pollen development and function. *Genome Res* **19**, 1786-1800.
- Guo, F. Q., Crawford, N. M. (2005) *Arabidopsis* nitric oxide synthase1 is targeted to mitochondria and protects against oxidative damage and dark-induced senescence. *Plant Cell* **17**, 3436-3450.
- Gupta, K. J., Zabalza, A., van Dongen, J. T. (2009) Regulation of respiration when the oxygen availability changes. *Physiol Plant* **137**, 383-391.
- Hanson, M. R., Bentolila, S. (2004) Interactions of mitochondrial and nuclear genes that affect male gametophyte development. *Plant Cell* **16**, 154-169.
- Hamilton, E. W., Heckathorn, S. A. (2001) Mitochondrial Adaptations to NaCl. Complex I is protected by anti-oxidants and small heat shock proteins, whereas complex II is protected by proline and betaine. *Plant Physiol* **126**, 1266-1274.
- Harmon, A. C., Yoo, B. C., McCaffery, C. (1994) Pseudosubstrate inhibition of CDPK, a protein kinase with a calmodulin-like domain. *Biochemistry* **33**, 7278-7287.
- Harper, J. F., Huang, J. F., Lloyd, S. J. (1994) Genetic identification of an autoinhibitor in CDPK, a protein kinase with a calmodulin-like domain. *Biochemistry* **33**, 7267-7277.
- Hashida, T., Kotake, Y., Ohta, S. (2011) Protein disulfide isomerase knockdown-induced cell death is cell-line dependent and involves apoptosis in MCF-7 cells. *J Toxicol Sci*, **36** (1), 1-7.

- Haslbeck, M., Ignatiou, A., Saibil, H., Helmich, S., Frenzl, E., Stromer, T., Buchner, J. (2004) A domain in the N-terminal part of Hsp26 is essential for chaperone function and oligomerization. *J Mol Biol* **343**, 445-455.
- Haucke, V., Schatz, G. (1997) Import of proteins into mitochondria and chloroplasts. *Trends Cell Biol* **7**, 103-106.
- Hauser, B. A., Sun, K., Oppenheimer, D. G., Sage, T. L. (2005) Changes in mitochondrial membrane potential and accumulation of reactive oxygen species precede ultrastructural changes during ovule abortion. *Planta* **223**, 492-499.
- Heazlewood, J. L., Tonti-Filippini, J. S., Gout, A. M., Day, D. A., Whelan, J., Millar, A. H. (2004) Experimental analysis of the *Arabidopsis* mitochondrial proteome highlights signaling and regulatory components, provides assessment of targeting prediction programs, and indicates plant-specific mitochondrial proteins. *Plant Cell* **16**, 241-256.
- Heazlewood, J. L., Verboom, R. E., Tonti-Filippini, J., Small, I., Millar, A. H. (2007) SUBA: the *Arabidopsis* subcellular database. *Nucleic Acids Res* **35**, Onlineveröffentlichung.
- Hebelstrup, K. H., Igamberdiev, A. U., Hill, R. D. (2007) Metabolic effects of hemoglobin gene expression in plants. *Gene* **398**, 86-93.
- Hedtke, B., Börner, T., Weihe, A. (1997) Mitochondrial and chloroplast phage-type RNA polymerases in *Arabidopsis*. *Science* **277**, 809-811.
- Hetherington, A. M., Woodward, F. I. (2003) The role of stomata in sensing and driving environmental change. *Nature* **424**, 901-908.
- Hetherington, A. M., Brownlee, C. (2004) The generation of Ca^{2+} -signals in plants. *Annu Rev Plant Biol* **55**, 401-427.
- Hinrichsen, I., Bolle, N., Paun, L., Kempken, F. (2009) RNA processing in plant mitochondria is independent of transcription. *Plant Mol Biol* **70**, 663-668.
- Ho, L. H. M., Giraud, E., Uggalla, V., Lister, R., Clifton, R., Glen, A., Thirkettle-Watts, D., Van Aken, O., Whelan, J. (2008) Identification of regulatory pathways controlling gene expression of stress-responsive mitochondrial proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **147**, 1858-1873.
- Hoge, J. H. C., Springer, J., Wessels, J. G. H. (1982) Changes of complex RNA during fruit-body initiation in the fungus *Schizophyllum commune*. *Exp Mycol* **6**, 233-243.
- Hooley, R. (1994) Gibberellins: perception, transduction and responses. *Plant Mol Biol* **26**, 1529-1555.
- Horton, P., Park, K. J., Obayashi, T., Nakai, K. (2006) Protein subcellular localization prediction with WoLF PSORT. *Proceedings of the 4th Annual Asia Pacific Bioinformatics Conference APBC06*, Taipei, Taiwan, 39-48.

- Hosy, E., Vavasseur, A., Mouline, K., Dreyer, I., Gaymard, F., Porée, F., Boucherez, J., Lebaudy, A., Bouchez, D., Véry, A., Simmoneau, T., Thibaud, J., Sentenac, H. (2003) The *Arabidopsis* outward K⁺ channel GORK is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration. PNAS **100** (9), 5549-5554.
- Houston, N. L., Fan, C., Xiang, Q., Schulze, J. M., Jung, R., Boston, R. S. (2005) Phylogenetic analyses identify 10 classes of the protein disulfide isomerase family in plants, including single-domain protein disulfide isomerase-related proteins. Plant Physiol **137**, 762-778.
- Howe, C. J., Barbrook, A. C., Nisbet, R. E. R., Lockhart, P. J., Larkum, A. W. D. (2008) The origin of plastids. Phil Trans R Soc B **363**, 2675-2685.
- Howell, K. A., Cheng, K., Murcha, M. W., Jenkin, L. E., Millar, A. H., Whelan, J. (2007) Oxygen initiation of respiration and mitochondrial biogenesis in rice. J Biol Chem, **282** (21), 15619-15631.
- Hrabak, E. M., Chan, K. W. M., Gribskov, M., Harper, J. F., Choi, J., H., Halford, N., Kudla, J., Luan, S., Nimmo, H. G., Sussmann, M. R., Thomas, M., Walker-Simmons, K., Zhu, J., Harmon, A., C. (2003) The *Arabidopsis* CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. Plant Physiol **132**, 666-680.
- Hu, L., Liang, W., Yin, C., Cui, X., Zong, J., Wang, X., Hu, J., Zhang, D. (2011) Rice MADS3 regulates ROS homeostasis during late anther development. Plant Cell **23**, 515-533.
- Hua, S., Sun, Z. (2001) Support vector machine approach for protein subcellular localization prediction. Bioinformatics **17** (8), 721-728.
- Hubbard, K. E., Nishimura, N., Hitomi, K., Getzoff, E. D., Schroeder, J. I. (2010) Early abscisic acid signal transduction mechanisms: newly discovered components and newly emerging questions. Genes Dev **24**, 1695-1708.
- Ichas, F., Jouaville, L. S., Mazat, J. P. (1997) Mitochondria are excitable organelles capable of generating and conveying electrical and calcium signals. Cell **89**, 1145-1153.
- Igamberdiev, A. U, Gardeström, P. (2003) Regulation of NAD-und NADP-dependent isocitrate dehydrogenases by reduction levels of pyridine nucleotides in mitochondria and cytosol of pea leaves. Biochim Biophys Acta **1606**, 117-125.
- Igamberdiev, A. U., Hill, R. D. (2004) Nitrate, NO and haemoglobin in plant adaptation to hypoxia: an alternative to classic fermentation pathways. J Exp Bot **55**, 2473-2483
- Igamberdiev, A. U, Baron, K., Manac'h-Little, N., Stoimenova, M., Hill, R. D. (2005) The haemoglobin/nitric oxide cycle: involvement in flooding stress and effects on hormone signalling. Ann Bot **96**, 557-564.
- Igamberdiev, A. U, Hill, R. D. (2009) Plant mitochondrial function during anaerobiosis. Ann Bot **103**, 259-268.

- Inaba, T., Ito-Inaba, Y. (2010) Versatile roles of plastids in plant growth and development. *Plant Cell Physiol*, Onlineveröffentlichung.
- Inaba, T. (2010) Bilateral communication between plastid and the nucleus: Plastid protein import and plastid-to-nucleus retrograde signalling. *Biosci Biotechnol Biochem* **74** (3), 471-476.
- Ishida, S., Yuasa, T., Nakata, M., Takahashi, Y. (2008) A tobacco calcium-dependent protein kinase, CDPK1, regulates the transcription factor REPRESSION OF SHOOT GROWTH in response to gibberellins. *Plant Cell* **20**, 3273-3288.
- Isono, K., Shimizu, M., Yoshimoto, K., Niwa, Y., Satoh, K., Yokota, A., Kobayashi, H. (1997) Leaf-specifically expressed genes for polypeptides destined for chloroplasts with domains of $\sigma 70$ factors of bacterial RNA polymerases in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci* **94**, 14948-14953.
- Jackson, M. B. (2008) Ethylene-promoted elongation: an adaptation to submergence stress. *Ann Bot* **101**, 229-248.
- Jakobs, S. (2004) Mitochondrien - Dynamische Kraftwerke der Zelle. *MPIbp News* **12**, 1-4.
- Jaquinod, M., Villiers, F., Kieffer-Jaquinod, S., Hugovieux, V., Bruley, C., Garin, J., Bourguignon, J. (2007) A proteomics dissection of *Arabidopsis thaliana* vacuoles isolated from cell culture. *Mol Cell Proteomics* **6** (3), 394-412.
- Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A., Bevon, M. W. (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* **6**, 3901-3907.
- Jia, W., Zhang, J. (2008) Stomatal movements and long-distance signaling in plants. *Plant Signal Behav* **3** (10), 772-777.
- Jimenez, A., Creissen, G., Kular, B., Firmin, J., Robinson, S., Verhoeven, M., Mulinaux, P. (2002) Changes in oxidative processes and components of the antioxidant system during tomato fruit ripening. *Planta* **214**, 751-758.
- Jobson, R. W., Qiu, Y. L. (2008) Did RNA editing in plant organellar genomes originate under natural selection or through genetic drift? *Biol Direct* **3**, Onlineveröffentlichung.
- Joshi-Saha, A., Valom, C., Leung, J. (2011) Absciscic acid signal off the STARTing block. *Mol Plant* **4** (4), 562-580.
- Karbowski, M., Arnoult, D., Chen, H., Chan, D. C., Smith, C. L., Youle, R. J. (2004) Quantitation of mitochondrial dynamics by photolabeling of individual organelles shows that mitochondrial fusion is blocked during the Bax activation phase of apoptosis. *J Cell Biol* **164** (4), 493-499.
- Kawasaki, E. S., Wang, A. M. (1989) Detection of gene expression. Ehrlich HA (ed) *PCR Technology, principles and applications for DNA amplification*. Stockton Press, New York, 89-97.

- Kazemi, S., Kefford, N. P. (1974) Apical correlative effects in leaf epinasty of tomato. *Plant Physiol* **54**, 512-519.
- Keech, O., Pesquet, E., Gutierrez, L., Ahad, A., Bellini, C., Smith, S. M., Gardeström, P. (2010) Leaf senescence is accompanied by an early disruption of the microtubule network in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **154**, 1710-1720.
- Keech, O. (2011) The conserved mobility of mitochondria during leaf senescence reflects differential regulation of the cytoskeletal components in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal Behav* **6**(1), 147-150.
- Keller, T., Damude, H., Werner, D., Doerner, P., Dixon, R. A., Lamb, C. (1998) A plant homolog of the neutrophil NADPH oxidase gp91*phox* subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca²⁺ binding motifs. *Plant Cell* **10**, 255-266.
- Kempken, F., Bolle, N., Forner, J., Binder, S. (2007) Transcript end mapping and analysis of RNA editing in plant mitochondria. *Methods Mol Biol* **372**, 177-192.
- Keren, I., Bezawork-Geleta, A., Kolton, M., Maayan, I., Belausov, E., Levy, M., Mett, A., Gidoni, D., Shaya, F., Ostersetzer-Biran, O. (2009) AtnMat2, a nuclear-encoded maturase required for splicing of group-II introns in *Arabidopsis* mitochondria. *RNA* **15**, 2299-2311.
- Kirik, V., Grini, P. E., Mathur, J., Klinkhammer, I., Adler, K., Bechthold, N., Herzog, M., Bonneville, J. M., Hülskamp, M. (2002) The *Arabidopsis* *TUBULIN-FOLDING COFACTOR A* gene is involved in the control of the α/β -tubulin monomer balance. *Plant Cell* **14**, 2265-2276.
- Kita, K., Oya, H., Cennis, R. B., Ackrell, B. A. C., Kasahara, M. (1990) Human complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase): cDNA cloning of iron sulfur subunit of liver mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* **166** (1), 101-108.
- Kitagaki, H., Cowart, L. A., Matmati, N., de Avalos, S. V., Novgorodov, S. A., Zeidan, Y. H., Bielawski, J., Obeid, L. M., Hannun, Y. A. (2007) Isc1 regulates sphingolipid metabolism in yeast mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **1768** (11), 2849-2861.
- Kleffmann, T., Russenberger, D., von Zychlinski, A., Christopher, W., Sjö, K., Grussem, W., Baginsky, S. (2004) The *Arabidopsis thaliana* chloroplast proteome reveals pathway abundance and novel protein functions. *Curr Biol* **14**, 354-362.
- Kobayashi, M., Ohura, I., Kawatika, K., Yokota, N., Fujiwara, M., Shimamoto, K., Doke, N., Yohioka, H. (2007) Calcium-dependent protein kinases regulate the production of reactive oxygen species by potato NADPH oxidase. *Plant Cell* **19**, 1065-1080.
- Koncz, C., Schell, J. (1986) The promotor of T-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol Gen Genet* **204**, 383-396.
- Kopczak, S. D., Haas, N. A., Hussey, P. J., Silflowa, C. D., Snustad, P. D. (1992) The small genome of *Arabidopsis* contains at least six expressed α -tubulin genes. *Plant Cell* **4**, 539-547.

- Koroleva, O. A., Tomlinson, M. L., Leader, D., Shaw, P., Doonan, J. H. (2005) High-throughput protein localization in *Arabidopsis* using *Agrobacterium*-mediated transient expression of GFP-ORF Fusions. *Plant J* **41**, 162-174.
- Kotchoni, S. O., Laarimore, K. E., Mukherjee, M., Kempinski, C. F., Barth, C. (2009) Alterations in the endogenous ascorbic acid content affect flowering time in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **149**, 803-815.
- Kozaki, A., Hake, S., Colasanti, J. (2004) The maize ID1 flowering time regulator is a zinc finger protein with novel DNA binding properties. *Nucl Acids Res* **32** (5), 1710-1720.
- Krizek, B. A. (2011) Aintegumenta and Aintegumenta-Like6 regulate auxin-mediated flower development in *Arabidopsis*. *BMC Res Notes* **4** (176), 1-8.
- Küchler, M., Decker, S., Hörmann, F., Soll, J., Heins, L. (2002) Protein import into chloroplasts involves redox-regulated proteins. *EMBO J* **21**, 6136-6145.
- Lahaye, A., Stahl, H., Thines-Sempoux, D., Foury, F. (1991) PIF1: a DNA- helicase in yeast mitochondria. *EMBO J* **10** (4), 997-1007.
- Laloi, C., Apel, K., Danon, A. (2004) Reactive oxygen signalling: the latest news. *Curr Opin. Plant Biol* **7**, 323-328.
- Lambeth, D. J. (2004) NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* **4**, 181-189.
- Lämmli, U. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Langridge, J. (1957) Effect of day-length and gibberellic acid on the flowering of *Arabidopsis*. *Nature* **180**, 36-37.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., Higgins, D. G. (2007) ClustalW and ClustalX version 2.0. *Bioinformatics*, **23** (1), 2947-2948.
- Lecellier, G., Silar, P. (1994) Rapid methods for nucleic acids extraction from petri dish grown mycelia. *Curr Genet* **25**, 122-123.
- Lecourieux, D., Mazars, C., Pauly, N., Ranjeva, R., Pugin, A. (2002) Analysis and effects of cytosolic free calcium increases in response to elicitors in *Nicotiana plumbaginifolia* Cells. *Plant Cell* **14**, 2627-2641.
- Lee, K. H., Piao, H. L., Kim, H.-Y., Choi, S., M., Jiang, F., Hartung, W., Hwang, I., Kwak, J. M., Lee, I.-J., Hwang, I. (2006) Activation of glucosidase via stress-induced polymerization rapidly increases active pools of abscisic acid. *Cell* **126**, 1109-1120.
- Lee, J. Y., Colinas, J., Wang, J. Y., Mace, D., Ohler, U., Benfey, P. N. (2005) Transcriptional and posttranscriptional regulation of transcription factor expression in *Arabidopsis* roots. *PNAS* **103** (15), 6055-6060.

- Lee, S. J., Warmke, H. E. (1979) Organelle size and number in fertile and T-cytoplasmic male-sterile corn. *Amer J Bot* **66** (2), 141-148.
- Leino, M., Thyselius, S., Landgren, M., Glimelius, K. (2004) *Arabidopsis thaliana* chromosome III restores fertility in a cytoplasmic male-sterile *Brassica napus* line with *A. thaliana* mitochondrial DNA. *Theo Appl Genet* **109**, 272-279.
- Leister, D. (2005) Genomics-based dissection of the cross-talk of chloroplasts with the nucleus and mitochondria in *Arabidopsis*. *Gene* **354**, 110-116.
- Leon, P., Arroyo, A., Mackenzie, S. (1998) Nuclear control of plastid and mitochondrial development in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**, 453-480.
- Li, W., Zhang, X., Xia, C., Deng, Y., Ye, D. (2010) *MALE GAMETOPHYTE DEFECTIVE 1*, encoding the F_{AD} subunit of mitochondrial F₁F₀-ATP synthase, is essential for pollen formation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **51** (6), 923-935.
- Licausi, F., Giorgi, F. M., Zenoni, S., Osti, F., Pezzotti, M., Perata, P. (2010) Genomic and transcriptomic analysis of the AP2/ERF superfamily in *Vitis vinifera*. *BMC Genomics* **11**, 1-15.
- Lim, P. O., Kim, H. J., Nam, H. G. (2007) Leaf senescence. *Annu Rev Plant Biol* **58**, 115-136.
- Lindermayr, C., Saalbach, G., Bahnweg, G., Durner, J. (2006) Differential inhibition of *Arabidopsis* methionine adenosyltransferases by protein S-nitrosylation. *J Biol Chem* **281** (7), 4285-4291.
- Linka, N., Theodoulou, F. L., Haslam, R. P., Linka, M., Napier, J. A., Neuhaus, H. E., Weber, A. P. M. (2008) Peroxisomal ATP import is essential for seedling development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **20**, 3241-3257.
- Lister, R., Chew, O., Lee, M., Heazlewood, J., Clifton, R., Parker, K. L., Millar, A. H., Whelan, J. (2004) A transcriptomic and proteomic characterization of the *Arabidopsis* mitochondrial protein import apparatus and its response to mitochondrial dysfunction. *Plant Physiol* **134**, 777-789.
- Liu, B., Joshi, H. C., Wilson, T. J., Silflow, C. D., Palewitz, B. A., Snustad, D. P. (1994) Gamma-Tubulin in *Arabidopsis*: gene sequence, immunoblot, and immunofluorescence studies. *Plant Cell* **6** (2), 303-314.
- Liu, F., Van Toai, T., Moy, L. P., Bock, G., Linford, L. D., Quackenbush, J. (2005) Global transcription profiling reveals comprehensive insights into hypoxic response in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **137**, 1115-1125.
- Liu, T., Belov, M. E., Jaitly, N., Qian, W. J., Smith, R. D. (2007) Accurate mass measurements in proteomics. *Chem Rev* **107** (8), 3621-3653.
- Liu, Y., Ye, N., Liu, R., Chen, M., Zhang, J. (2010) H₂O₂ mediates the regulation of ABA catabolism and GA biosynthesis in *Arabidopsis* seed dormancy and germination. *J Exp Bot* **61** (11), 2979-2990.

- Liu, Z., Butow, R. A. (1999) A transcriptional switch in the expression of yeast tricarboxylic acid cycle genes in response to a reduction or loss of respiratory function. *Mol Cell Biol* **19** (10), 6720-6728.
- Loeffler, C., Berger, S., Guy, A., Durand, T., Bringmann, G., Dreyer, M., von Rad, U., Durner, J., Mueller, M. J. (2005) B1-phytoprostanes trigger plant defense and detoxification responses. *Plant Physiol.* **137**, 328-340.
- Logan, D. C., Leaver, C. J. (2000) Mitochondria-targeted GFP highlights the heterogeneity of mitochondrial shape, size and movement within living plant cells. *J Exp Bot* **51** (346), 865-871.
- Logan, D. C. (2006) The mitochondrial compartment. *J Exp Bot* **57** (6), 1225-1243.
- Logan, D. C. (2006) Plant mitochondrial dynamics. *Biochim Biophys Acta* **1763**, 430-441.
- Logan, D. C. (2010) The dynamic plant chondriome. *Semin Cell Dev Biol* **21**, 550-557.
- Lopez-Molina, Maongrand, S., Chua, N. (2001) A postgermination developmental arrest checkpoint is mediated by abscisic acid and requires the ABI5 transcription factor in *Arabidopsis*. *PNAS* **98** (8), 4782-4787.
- Lorbiecke, R., Sauter, M. (1999) Adventitious root growth and cell-cycle induction in deepwater rice. *Plant Physiol* **119**, 21-30.
- Lu, P. D., Christopher, D. A. (2008) Endoplasmic reticulum stress activates the expression of a sub-group of protein disulfide isomerase genes and AtbZIP60 modulates the response in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Genet Genomics* **280**, 199-210.
- Lynch, D. V., Dunn, T. M. (2004) An introduction to plant sphingolipids and a review of recent advances in understanding their metabolism and function. *New Phytol* **161**, 677-702.
- Ma, S., Wu, W. (2007) AtCPK23 functions in *Arabidopsis* responses to drought and salt Stresses. *Plant Mol Biol* **65**, 51-518.
- Ma, Y., Szostkiewicz, I., Korte, A., Moes, D., Yang, Y., Christmann, A., Grill, E. (2009) Regulators of PP2C Phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science* **324**, 1064-1067.
- Mahalingam, R., Jambunathan, N., Gunjan, S. K., Faustin, E., Weng, H., Ayoubi, P. (2006) Analysis of oxidative signalling induced by ozone in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ* **29**, 1357-1371.
- Maris, C., Dominguez, C., Allain, F. H. T. (2005) The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression. *FEBS J* **272**, 2118-2131.
- Mao, J., Zhang, Y., Sang, Y., Li, Q., Yang, H. (2005) A role for *Arabidopsis* cryptochromes and COP1 in the regulation of stomatal opening. *PNAS* **102** (34), 12270-12275.

- Mao, T., Jin, L., Li, H., Liu, B., Yuan, M. (2005) Two microtubule-associated proteins of the *Arabidopsis* MAP65 family function differently on microtubules. *Plant Physiol* **138**, 654-662.
- Marten, H., Konrad, K. R., Dietrich, P., Roelfsema, R. G., Hedrich, R. (2007) Ca^{2+} -dependent and -independent abscisic acid activation of plasma membrane anion channels in guard cells of *Nicotiana tabacum*. *Plant Physiol* **143**, 28 – 37.
- McCormack, E., Braam, J. (2003) Calmodulins and related potential calcium sensors of *Arabidopsis*. *New Phytol* **152**, 585-598.
- Melser, C., Klinkhamer, P. G. L. (2001) Selective seed abortion increases offspring survival in *Cynoglossum officinale* (Boraginaceae). *Am J Bot* **88** (6), 1033-1040.
- Menges, M., Murray, J. A. H. (2002) Synchronous *Arabidopsis* suspension cultures for analysis of cell-cycle gene activity. *Plant J* **30** (2), 203-212.
- Meyer, E. H., Taylor, N. L., Millar, A. H. (2008) Resolving and identifying protein components of plant mitochondrial respiratory complexes using three dimensions of gel electrophoresis. *J Proteome Res* **7**, 786.794.
- Millar, A. H., Trend, A. E., Heazlewood, J. L. (2004) Changes in the mitochondrial proteome during the anoxia to air transition in rice focus around cytochrome-containing respiratory complexes. *J Biol Chem* **279**, 39471-39478.
- Miller, R. E., Grant, N. M., Giles, L., Ribas-Carbo, M., Berry, J. A., Watling, J. R., Robinson, S. A. (2010) In the heat of the night – alternative pathway respiration drives thermogenesis in *Philodendron bipinnatifidum*. *New Phytol*, Onlineveröffentlichung.
- Miyashita, Y., Good, A. G. (2008) Contribution of the GABA shunt to hypoxia-induced alanine accumulation in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **49** (1), 92-102.
- Mitra, S. K., Gantt, J. A., Ruby, J. F., Clouse, S., D., Goshe, M., B. (2007) Membrane proteomic analysis of *Arabidopsis thaliana* using alternative solubilization techniques. *J Proteome Res* **6**, 1933-1950.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Van Breusegem, F. (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci* **9** (10), 490-498.
- Mohr, G., Lambowitz, A. M. (2003) Putative proteins related to group II intron reverse transcriptase/maturases are encoded by nuclear genes in higher plants. *Nucleic Acids Res* **32**, 647-652.
- Mommer, L., Visser, E. J. W. (2005) Underwater photosynthesis in flooded terrestrial plants: a matter of leaf plasticity. *Ann Bot* **96**, 581-589.
- Monshausen, G. B., Bibikova, T. N., Weisenseel, M. H., Gilroy, S. (2009) Ca^{2+} regulates reactive oxygen species production and pH during mechanosensing in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell* **29**, 2341-2356.

- Moreau, B., Nelson, C., Parekh, A. B., (2006) Biphasic regulation of mitochondrial Ca^{2+} uptake by cytosolic Ca^{2+} concentration. *Curr Biol* **16**, 1672-1677.
- Morgan, J. M., Lehmann, M., Schwarzländer, M., Baxter, C. J., Sienkiewicz-Porzucek, A., Williams, T. C. R., Schauer, N., Fernie, A. R., Fricker, M. D., Ratcliffe, R. G., Sweetlove, L. J., Finkemeier, I. (2008) Decrease in manganese superoxide dismutase leads to reduced root growth and affects tricarboxylic acid cycle flux and mitochondrial redox homeostasis. *Plant Physiol* **147**, 101-114.
- Morgan, J. M. (1980) Possible role of abscisic acid in reducing seed set in water-stressed wheat plants. *Nature* **285**, 655-657.
- Morita, M. T., Sakaguchi, K., Kiyose, S., Taira, K., Kato, T., Nakamura, M., Tasaka, M. (2006) A C2H2-type zinc finger protein, SGR5, is involved in early events of gravitropism in *Arabidopsis* inflorescence stems. *Plant Journal* **47**, 619-628.
- Mukhopadhyay, A., Hammen, P., Waltner-Law, M., Weiner, H. (2002) Timing and structural consideration for the processing of mitochondrial matrix space proteins by the mitochondrial processing peptidase (MPP). *Protein Sci* **11**, 1026-1035.
- Munemasa, S., Hossain, M. A., Nakamura, Y., Mori, I. C., Murata, Y. (2011) The *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase, CPK6, functions as a positive regulator of methyl jasmonate signaling in guard cells. *Plant Physiol* **155**, 553-561.
- Murcha, M. W., Elhafez, D., Millar, A. H., Whelan, J. (2004) The N-terminal extension of plant mitochondrial carrier proteins is removed by two-step processing: the first cleavage is by the mitochondrial processing peptidase. *J Mol Biol* **344**, 443-454.
- Mustilli, A., Merlot, S., Vavasseur, A., Fenzi, F., Giraudat, J. (2002) *Arabidopsis* OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production. *Plant Cell* **14**, 3089-3099.
- Mustroph, A., Zanetti, M. E., Jang, C. J. H., Holtan, H. E., Repetti, P. P., Galbraith, D. W., Girke, T., Bailey-Serres, J. (2009) Profiling translatomes of discrete cell populations resolves altered cellular priorities during hypoxia in *Arabidopsis*. *PNAS* **106** (44), 18843-18848.
- Myers, C., Romanowsky, S. M., Barron, Y. D., Garg, S., Azuse, C. L., Curran, A., Davis, R. M., Hatton, J., Harmon, A. C., Harper, J. F. (2009) Calcium-dependent protein kinases regulate polarized tip growth in pollen tubes. *Plant J* **59**, 528-539.
- Nadimpalli, R., Yalpani, N., Johal, G. S., Simmons, C. R. (2000) Prohibitins, stomatins, and plant disease response genes compose a protein superfamily that controls cell proliferation, ion channel regulation, and death. *J Biol Chem* **275** (38), 29579-29586.
- Nakagawa, N., Sakurai, N. (2006) A mutation in At-nMat1a, which encodes a nuclear gene having high similarity to group II intron maturase, causes impaired splicing of mitochondrial NAD4 transcript and altered carbon metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **47** (6), 772-783.
- Nakamoto, H., Vigh, L. (2007) The small heat shock proteins and their clients. *Cell Mol Life Sci* **64**, 294-306.

- Nakata, M., Yuasa, T., Takahashi, Y., Ishida, S. (2009) CDPK1, a calcium-dependent protein kinase, regulates transcriptional activator RSG in response to gibberellins. *Plant Signal Behav* **4** (5), 372-374.
- Neuman, D. S., Smit, B. A. (1991) The influence of leaf water status and ABA on leaf growth and stomata of *Phaseolus* seedlings with hypoxic roots. *J Exp Bot* **42** (245), 1499-1506.
- Neupert, W., Herrmann, J. M. (2007) Translocation of proteins into mitochondria. *Annu Rev Biochem* **76**, 723-749.
- Newmeyer, D. D., Ferguson-Miller, S. (2003) Mitochondria: Releasing power for life review and unleashing the machineries of death. *Cell* **112**, 481-490.
- Newton, K. J. (1994) Procedures for isolating mitochondria and mitochondrial DNA and RNA. In: Freeling, M. und Walbot, V., (Eds) *The maize handbook*, 549-556. Springer, New York.
- Newton, K. J., Gabay-Laughnan, S., De Paepe, R. (2004) Mitochondrial mutations in plants. In: Day, D. A., Millar, A. H., Whelan, J. (Eds.) *Advances in Photosynthesis and Respiration*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Band 17, 121-142.
- Ng, C. K. Y., Carr, K., McAinsh, M. R., Powell, B., Hetherington, A. M. (2001) Drought-induced guard cell signal transduction involves sphingosine-1-phosphate. *Nature* **410**, 596-599.
- Nie, X., Hill, R. D. (1997) Mitochondrial respiration and hemoglobine gene expression in barley aleurone tissue. *Plant Physiol* **114**, 835-840.
- Odagiri, K., Katoh, H., Kawashima, H., Tanaka, T., Ohtani, H., Saotome, M., Urushida, T., Satoh, H., Hayashi, H. (2009) Local control of mitochondrial membrane potential, permeability transition pore and reactive oxygen species by calcium and calmodulin in rat ventricular myocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology* **46**, 989-997.
- Oliver, S. N., Dennis, E. S., Dolferus, R. (2007) ABA regulates apoplastic sugar transport and is a potential signal for cold-induced pollen sterility in rice. *Plant Cell Physiol* **48** (9), 1319-1330.
- Oshima, T., Yamasaki, E., Ogishima, T., Kadowaki, K., Ito, A., Kitada, S. (2005) Recognition and processing of a nuclear-encoded polypeptide precursor by mitochondrial processing peptidase. *Biochem J* **385**, 755-761.
- Osteryoung, K. W., Nunnari, J. (2003) The division of endosymbiotic organelles. *Science* **302**, 1698-1704.
- Overmyer, K., Brosché, M., Kangasjärvi, J. (2003) Reactive oxygen species and hormonal control of cell death. *Trends Plant Sci* **8** (7), 335-342.
- Paitian, N. A., Markossian, K. A., Nalbandyan, R. M. (1985) The effect of nitrite on cytochrom oxidase. *Biochem Biophys Res Commun* **133**, 1104-1111.

- Park, S., Fung, P., Nishimura, N., Jensen, D. R., Fujii, H., Zhao, Y., Lumba, S., Santiago, J., Rodrigues, A., Cow, T. F., Alfred, S. E., Bonetta, D., Finkelstein, R., Provar, N., Desveaux, D., Rodriguez, P. L., McCourt, P., Zhu, J., Schroeder, J. I., Volkman, B. F., Cutler, S. R. (2009) Absciscic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science* **324**, 1068-1071.
- Pastore, D., Trono, D., Laus, M. N., Di Fonzo, N., Flagella, Z. (2007) Possible plant mitochondria involvement in cell adaptation to drought stress. *J Exp Bot* **58** (2), 195-210.
- Patharkar, O. ., Cushman, J. C. (2006) A novel coiled-coil protein co-localizes and interacts with a calcium-dependent protein kinase in the common ice plant during low-humidity stress. *Planta* **225**, 57-73.
- Pazmiño, D. M., Rodríguez-Serrano, M., Romero-Puertas, M. C., Archilla-Ruiz, A., Del Río, L. A., Sandalio, L. M. (2011) Differential response of young and adult leaves to herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in pea plants: role of reactive oxygen species. *Plant Cell Environ*, Onlineveröffentlichung.
- Pearce, L. L., Kanai, A. J., Birder, L. A., Pitt, B. R., Peterson, J. (2002) The catabolic fate of nitric oxide. *J Biol Chem* **277**, 13556-13562.
- Pearson, W. R., Lipman, D. J. (1989) Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci USA* **85** (8), 2444-2448.
- Peeters, N. M., Chapron, A., Giritch, A., Grandjean, O., Lancelin, D., Lhomme, T., Vivrel, A., Small, I. (2000) Duplication and quadruplication of *Arabidopsis thaliana* cysteinyl- and asparaginyl-tRNA synthetase genes of organellar origin. *J Mol Evol* **50**, 413-423.
- Pei, Z., Murata, Y., Benning, G., Thomine, S., Kluessener, B., Allen, G. J., Grill, E., Schroeder, J. I. (2004) Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature* **406**, 731-734.
- Peng, X., Xu, W., Wang, Y., Huang, K., Liang, Z., Zhao, W., Luo, Y. (2010) Mycotoxin ochratoxin A-induced cell death and changes in oxidative metabolism of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep* **29**, 153-161.
- Perez, D. E., Hoyer, J. S., Johnson, A. I., Moody, Z. R., Lopez, J., Kaplinsky, N. J. (2009) BOBBER1 is a noncanonical *Arabidopsis* small heat shock protein required for both development and thermotolerance. *Plant Physiol* **151**, 241-252.
- Perkins, D., Pappin, D., Creasy, D., Cottrell, J. (1999) Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* **20** (18), 3551-3567.
- Perkins, G. A., Frey, T. G. (2000) Recent structural insight into mitochondria gained by microscopy. *Micron* **31**, 97-111.
- Petersen, N. H. T., Joensen, J., McKinney, L. V., Brodersen, P., Petersen, M., Hofius, D., Mundy, J. (2009) Identification of proteins interacting with *Arabidopsis* ACD11. *J Plant Physiol* **166**, 661-666.

- Pezeshki, S. R., Pardue, J. H., DeLaune, R. D. (1996a) Leaf gas exchange and growth of flood-tolerant and flood-sensitive tree species under low soil redox conditions. *Tree Physiol* **16**, 453-458.
- Pfaffl, M W. (2004) Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum, Sonderausgabe PCR* **10**, 92-95.
- Pinter, S., Aubert, S. D., Zakian, V. A. (2008) The *Schizosaccharomyces pombe* Pfh1p DNA helicase is essential for the maintenance of nuclear and mitochondrial DNA. *Mol Cell Biol* **28** (21), 6594-6608.
- Pitzschke, A., Hirt, H. (2006). Mitogen-activated protein kinases and reactive oxygen species signaling in plants. *Plant Physiol* **141**, 351-356.
- Planchet, E., Gupta, J., Sonoda, M., Kaiser, W. M. (2005) Nitric oxide emission from tobacco leaves and cell suspensions: rate limiting factors and evidence for the involvement of mitochondrial electron transport. *Plant J* **41**, 732-742.
- Plaxton, W. C. (1996) The organization and regulation of plant glycolysis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **47**, 185-214.
- Polidoros, A. N., Mylon, P. V., Arnholdt-Schmitt, B. (2009) *Aox* gene structure, transcript variation and expression in plants. *Physiol Plant* **137**, 342-353.
- Price, A. H., Taylor, A., Ripley, S. J., Griffiths, A., Trewavas, A. J., Knight, M. R. (1994) Oxidative signals in tobacco increase cytosolic calcium. *Plant Cell* **6**, 1301-1310.
- Prikryl, J., Watkins, K. P., Friso, G., van Wijk, K. J., Barkan, A. (2008) A member of the Whirly family is a multifunctional RNA- and DNA-binding protein that is essential for chloroplast biogenesis. *Nucleic Acids Res.* **36**, Onlineveröffentlichung.
- Pugh, C. W., o'Rourke, J. F., Nagao, M., Gleadle, J. M., Ratcliffe, P. J. (1997). Activation of hypoxia inducible factor-1; Definition of regulatory domains within the α subunit. *J Biol Chem* **272**, 11205-11214.
- Pusl, T., Wu, J. J., Zimmerman, T. L., Zhang, L., Ehrlich, B. E., Berchtold, M. W., Hoek, J. B., Karpen, S. J., Nathanson, M. H., Bennett, A. M. (2002) Epidermal growth factor-mediated activation of the ETS domain transcription factor Elk-1 requires nuclear calcium. *J Biol Chem* **277**, 27517-27527.
- Radi, A., Lange, T., Niki, T., Koshioka, M., Lange, M. J. P. (2006) Ectopic expression of pumpkin gibberellin oxidases alters gibberellin biosynthesis and development of transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant Physiol* **140**, 528-536.
- Ratcliffe, P. J., o'Rourke, J. F., Maxwell, P. H., Pugh, C. W. (1998) Oxygen sensing, hypoxia-inducible factor-1 and the regulation of mammalian gene expression. *J Exp Biol* **201**, 1153-1162.
- R Development Core Team (2011) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, ISBN 3-900051-07-0.

- Reiss, B., Sprengel, R., Schaller, H. (1984) Protein fusions with the kanamycin resistance gene from transposon Tn5. *EMBO J* **3** (13), 3317-3322.
- Reymond, P., Bodenhausen, N., Van Poecke, R. M. P., Krishnamurthy, V., Dicke, M., Farmer, E. E. (2004) A conserved transcript pattern in response to a specialist and a generalist herbivore. *Plant Cell* **16**, 3132-3147.
- Rhoads, D. M., Umbach, A. L., Subbaiah, C. C., Siedow, J. N. (2006) Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signalling. *Plant Physiol* **141**, 357-366.
- Rhoads, D. M., Subbaiah, C. C. (2007) Mitochondrial retrograde regulation in plants. *Mitochondrion* **7**, 177-194.
- Rice, P., Longden, I., Bleasby, A. (2000) EMBOS: The European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genet* **16** (6), 276-277.
- Rigas, S., Daras, G., Laxa, M., Marathias, N., Fasseas, C., Sweetlove, L. J., Hatzopoulos, P. (2009) Role of Lon1 protease in post-germinative growth and maintenance of mitochondrial function in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* **181** (3), 588-600.
- Rigobello, M. P., Donella-Deana, A., Cesaro, L., Bindoli, A. (2000) Isolation, purification and characterization of a rat liver mitochondrial protein disulfide isomerase. *Free Radic Biol Med* **28** (2), 266-272.
- Rizzuto, R., Marchi, S., Bonora, M., Aguiari, P., Bononi, A., De Stefania, D., Giogi, C., Leo, S., Rimessei, A., Siviero, R., Zecchini, E., Pinton, P. (2009) Ca^{2+} transfer from the ER to mitochondria: when, how and why. *Biochim Biophys Acta* **1787** (11), 1342-1352.
- Rocha, M., Licausi, F., Araújo, W. L., Nunes-Nesi, A., Sodek, L., Fernie, A. R., van Dongen, J. T. (2010) Glycolysis and the tricarboxylic acid cycle are linked by alanine aminotransferase during hypoxia induced by waterlogging of *Lotus japonicus*. *Plant Physiol* **152**, 1501-1513.
- Rochaix, J. D. (2001) Posttranscriptional control of chloroplast gene expression. From RNA to photosynthetic complex. *Plant Physiol* **125**, 142-144.
- Rodermel, S. (2001) Pathways of plastid-to-nucleus signalling. *Trends Plant Sci* **6**, 471-478.
- Rodriguez Milla, M. A., Uno, Y., Chang, I.F., Townsend, J., Maher, E. A., Quilici, D., Cushman, J. (2006) A novel yeast two-hybrid approach to identify CDPK substrates: Characterization of the interaction between AtCPK11 and AtDi19, a nuclear zinc finger protein. *FEBS Lett* **580**, 904-911.
- Romeis, T., Ludwig, A. A., Martin, R., Jones, J. D. G. (2001) Calcium-dependent protein kinases play an essential role in a plant defence response. *EMBO J* **20** (20), 5556-5567.
- Ruy, F., Vercesi, A. E., Andrade, P. B. M., Bianconi, L. M., Chaimovich, H., Kowaltowski, A. J. (2004) A highly active ATP-insensitive K^+ import pathway in plant mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* **36** (2), 195-202.

- Ryan, M. T., Hoogenraad, N. J. (2007) Mitochondrial-nuclear communications. *Annu Rev Biochem* **76**, 701-722.
- Sagi, M., Fluhr, R. (2001) Superoxide production by plant homologues of the gp91(phox) NADPH oxidase: modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol* **126**, 1281-1290.
- Sagi, M., Fluhr, R. (2006) Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases. *Plant Physiol* **141**, 336-340.
- Saisho, D., Nakazono, M., Lee, K. H., Tsutsumi, N., Akita, S., Hirai, A. (2001) The gene for alternative oxidase-2 (*AOX2*) from *Arabidopsis thaliana* consists of five exons unlike other *AOX* genes and is transcribed at an early stage during germination. *Genes Genet Syst* **76**, 89-97.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA-polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, zweite Ausgabe, Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, New York.
- Sánchez-Casas, P., Klessig, D. F. (1994) A salicylic acid-binding salicylic acid-inhibitable catalase activity and a activity are present in a variety of plant species. *Plant Physiol* **106**, 1675-1679.
- Sanders, D., Pelloux, J., Brownlee, C., Harper, J.F. (2002) Calcium at the crossroads of signaling. *Plant Cell Suppl*, 401-417.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Prac Natl Acad Sci USA* **74**, 5463-5467.
- Salceda, S., Caro, J. (1997) Hypoxia-inducible factor 1a (HIF-1a) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. *J Biol Chem* **272**, 22642-22647.
- Sappl, P. G., Carroll, A. J., Clifton, R., Lister, R., Whelan, J., Millar, A. H., Singh, K. B. (2009) The *Arabidopsis* glutathione transferase gene family displays complex stress regulation and co-silencing multiple genes results in altered metabolic sensitivity to oxidative stress. *Plant J* **58**, 53-68.
- Saraste, M. (1999) Oxidative phosphorylation at the *fin de siècle*. *Science* **283**, 1488-1493.
- Sorry, J., Kuhn, L., Ducruix, C., Lafaye, A., Junot, C., Hugovieux, V., Jourdain, A., Bastien, O., Fievet, J. B., Vailhen, D., Amekraz, B., Moulin, C., Ezan, E., Garin, J., Bourguignon, J. (2006) The early responses of *Arabidopsis thaliana* cells to cadmium exposure explored by protein and metabolite profiling analyses. *Proteomics* **6** (7), 2180-2198.

- Scharf, K. D., Siddique, M., Vierling, E. (2001) The expanding family of *Arabidopsis thaliana* small heat stress proteins and a new family of proteins containing α -crystallin domains (Acid proteins). *Cell Stress Chaperones* **6** (3), 225-237.
- Scheible, W. R., Fry, B., Kochevenko, A., Schindelasch, D., Zimmerli, L., Somerville, S., Loria, R., Somerville, C. R. (2003) An *Arabidopsis* mutant resistant to thaxtomin A, a cellulose synthesis inhibitor from *Streptomyces* Species. *Plant Cell* **15**, 1781-1794.
- Schmid, M., Davison, T. S., Henz, S. R., Pape, U. J., Demar, M., Vingron, M., Schölkopf, B., Weigel, D., Lohmann, J. U. (2005) A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nat Gen* **37**, 501-506.
- Schwacke, R., Fischer, K., Ketelsen, B., Krupinska, K., Krause, K. (2006) Comparative survey of plastid and mitochondrial targeting properties of transcription factors in *Arabidopsis* and rice. *Mol Genet Genomics* **277**, 631-646.
- Scott, I., Logan, D. C. (2008) Mitochondrial morphology transition is an early indicator of subsequent cell death in *Arabidopsis*. *New Phytol* **177**, 90-101.
- Sessions, A., Burke, E., Presting, G., Aux, G., McElver, J., Patton, D., Dietrich, B., Ho, P., Bacwaden, J., Ko, C., Clarke, J. D., Cotton, D., Bullis, D., Snell, J., Miguel, T., Hutchison, D., Kimmerly, B., Mitzel, T., Katagiri, F., Glazebrook, J., Law, M., Goff, S. A. (2002) A High-Throughput *Arabidopsis* Reverse Genetics System. *Plant Cell* **14**(12), 2985-2994.
- Seymour, R. S., Schultze-Motel, P. (1998) Physiological temperature regulation by the flower of the sacred lotus. *Phil Trans R Soc Lond B* **353**, 935-943.
- Shen, Z., Wang, G., Liu, Z., Zhang, H., Qiu, M., Zhao, X., Gan, Y. (2006) Network regulation of calcium signal in stomatal development. *Acta Pharmacol Sin* **27** (7), 950-958.
- Shi, L., Bielawski, J., Mu, J., Dong, H., Teng, C., Zhang, J., Yang, X., Tomishige, N., Hanada, K., Hannun, Y., Zuo, J. (2007) Involvement of sphingoid bases in mediating reactive oxygen intermediate production and programmed cell death in *Arabidopsis*. *Cell Res* **17**, 1030-1040.
- Shkolnik-Inbar, D., Bar-Zvi, D. (2010) ABI4 mediates abscisic acid and cytokinin inhibition of lateral root formation by reducing polar auxin transport in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **22**, 3560-3573.
- Sibbernsen, E., Mott, K. A. (2010) Stomatal responses to flooding of the intercellular air spaces suggest a vapor-phase signal between the mesophyll and the guard cells. *Plant Physiol* **153**, 1435-1442.
- Siddharta, K. P., Tuteja, N. (2007) Integrated signaling in flower senescence. *Plant Signal Behav* **2** (6), 437-445.
- Simoens, C., Alliotte, T., Mendel, R., Muller, A., Schiemann, J., Van Lijsebettens, M., Schell, J., Van Montagu, M., Inzé, D. (1986) A binary vector for transferring genomic libraries to plants. *Nucleic Acids Res* **14** (20), 8073-8090.

- Small, I., Peeters, N., Legeai, F., Lurin, C. (2004) Predotar: A tool for rapidly screening proteomes for N-terminal targeting sequences. *Proteomics* **4** (6), 1581-1590.
- Smertenko, A., Blume, Y., Viklicky, V., Opatrny, Z., Draber, P. (1997) Post-translational modifications and multiple tubulin isoforms in *Nicotiana tabacum* L. cells. *Planta* **201**, 349-358.
- Smit, B. A., Neuman, D. S., Stachowiak, M. L. (1990) Root hypoxia reduces leaf growth. *Plant Physiol* **92**, 1021-1028.
- Smith, A. M. O., Racliffe, G., Sweetlove, L. J. (2004) Activation and function of mitochondrial uncoupling protein in plants. *J Biol Chem* **279** (50), 51944-51952.
- Smith, A. P., Nourizadeh, S. E., Peer, W. A., Xu, J., Bandhyopadhyay, A., Murphy, A. S., Goldsbrough, P. B. (2003) *Arabidopsis* ATGSTF2 is regulated by ethylene and auxin and encodes a glutathione-S-transferase that interacts with flavonoids. *Plant J* **36**, 433-442.
- Smyth, D. R., Bowman, J. L., Meyerowitz, E. M. (1990) Early flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **2**, 755-767.
- Snustad, P. D., Haas, N. A., Kopczak, S. D., Silflow, C. D. (1992) The small genome of *Arabidopsis* contains at least nine expressed P-tubulin genes. *Plant Cell* **4**, 549-556.
- Soll, J., Schleiff, E. (2004) Protein import into chloroplasts. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 198-208.
- Steffens, B., Sauter, M. (2010) G proteins as regulators in ethylene-mediated hypoxia signalling. *Plant Signal Behav* **5** (4), 375-378.
- Stengel, A., Benz, J. P., Soll, J., Bölter, B. (2010) Redox-regulation of protein import into chloroplasts and mitochondria. *Plant Signal Behav* **5** (2), 105-109.
- Stewart, G. W., Argent, A. C., Dash, B. J. C. (1993) Stomatin: a putative cation transport regulator in the red cell membrane. *Biochim Biophys Acta* **1225**, 15-25.
- Subbaiah, C. C., Bush, D. S., Sachs, M. M. (1998) Mitochondrial contribution to the anoxic Ca^{2+} signal in maize suspension-cultured cells. *Plant Physiol* **118**, 759-771.
- Subbaiah, C. C., Zhang, J., Sachs, M. M. (1994) Involvement of intracellular calcium in anaerobic gene expression and survival of maize seedlings. *Plant Physiol* **105**, 369-376.
- Sudan, C., Prakash, S., Bhomkar, P., Jain, S., Bhalla-Sarin, N. (2006) Ubiquitous presence of β -glucuronidase (GUS) in plants and its regulation in some model plants. *Planta* **224**, 853-864.
- Suhita, D., Kolla, V. A., Vavasseur, A., Raghavendra, A. S. (2003) Different signaling pathways involved during the suppression of stomatal opening by methyl jasmonate or abscisic acid. *Plant Sci* **164**, 481-488.

- Suhita, D., Raghavendra, A. S., Kwak, J. M., Vavasseur, A. (2004) Cytoplasmic alkalization precedes reactive oxygen species production during methyl jasmonate- and abscisic acid-induced stomatal closure. *Plant Physiol* **134**, 1536-1545.
- Sunderhaus, S., Klodmann, J., Lenz, C., Braun, H.-P. (2010) Supramolecular structure of the OXPHOS system in highly thermogenic tissue of *Arum maculatum*. *Plant Physiol Biochem* **48**, 265-272.
- Sun, K., Hunt, K., Hauser, B. A. (2004) Ovule abortion in *Arabidopsis* triggered by stress. *Plant Physiol* **135**, 2358-2367.
- Sun, Y., MacRae, T. H. (2005) Small heat shock proteins: molecular structure and chaperone function. *Cell Mol Life Sci* **62** (21), 2416-2476.
- Surpin, M., Larkin, R. M., Chory, J. (2002) Signal transduction between the chloroplast and the nucleus. *Plant Cell* **14**, 327-338.
- Suzuki, N., Mittler, R. (2006) Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signaling and destruction. *Physiol Plant* **126**, 45-51.
- Szal, B., Jolivet, Y., Hasenfratz-Sauder, M. P., Dizengremel, P., Rychter, A. M. (2003) Oxygen concentration regulates alternative oxidase expression in barley roots during hypoxia and post-hypoxia. *Physiol Plant* **119**, 494-502.
- Sweetlove, L.J., Heazlewood, J.L., Herald, V., Holtzapffel, R., Day, D.A., Leaver, C.J., Millar, A.H., (2002) The impact of oxidative stress on *Arabidopsis* mitochondria. *Plant J* **32**, 891-904.
- Tadege, M., Dupuis, I., Kuhlemeier, C. (1999) Ethanolic fermentation: new functions for an old pathway. *Trends Plant Sci* **4** (8), 320-325.
- Takahashi, Y., Berberich, T., Miyazaki, A., Seo, S., Ohashi, Y., Kusano, T. (2003) Spermine signalling in tobacco: activation of mitogenactivated protein kinases by spermine is mediated through mitochondrial dysfunction. *Plant J* **36**, 820-829.
- Takenaka, M., Brennicke, A. (2008) Multiplex single-base extension typing to identify nuclear genes required for RNA editing in plant organelles. *Nucleic Acids Res* **37**, Onlineveröffentlichung.
- Tanimoto, M., Tremblay, R., Colasanti, J. (2008) Altered gravitropic response, amyloplast sedimentation and circumnutation in the *Arabidopsis* shoot gravitropism 5 mutant are associated with reduced starch levels. *Plant Mol Biol* **67**, 57-69.
- Taylor, E. R., Nie, X. Z., MacGregor, A. W., Hill, R. D. (1994) A cereal haemoglobin gene is expressed in seed and root tissues under anaerobic conditions. *Plant Mol Biol* **24**, 853-862.
- Taylor, N. L., Rudhe, C., Hulett, J. M., Lithgow, T., Glaser, E., Day, D. A., Millar, A. H., Whelan, J. (2003a) Environmental stresses inhibit and stimulate different protein import pathways in plant mitochondria. *FEBS Lett* **547**, 125-130.

- Teixeira, R., Farbos, I., Glimelius, K. (2005) Expression levels of meristem identity and homeotic genes are modified by nuclear–mitochondrial interactions in alloplasmic male-sterile lines of *Brassica napus*. *Plant J* **42**, 731-742.
- Teyssier, E., Block, M. A., Douce, R., Jouyard, J. (1996) Is E37, a major polypeptide from plastid envelope, an S-adenosyl methionine-dependent methyltransferase? *Plant J* **10** (5), 903-912.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. (1994) ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl Acids Res* **22** (22), 4673-4680.
- Tiwari, B. S., Belenghi, B., Levine, A. (2002) Oxidative stress increased respiration and generation of reactive oxygen species, resulting in ATP depletion, opening of mitochondrial permeability transition, and programmed cell death. *Plant Physiol* **128**, 1271-1281.
- Tognetti, V. B., Mühlenbock, P., Van Breusegem, F. (2011) Stress homeostasis – the redox and auxin perspective. *Plant Cell Environ*, Onlineveröffentlichung.
- Torres, M. A., Onouchi, H., Hamada, S., Machida, C., Hammond-Kosack, K. E., Jones, J. D. G. (1998) six *Arabidopsis thaliana* homologues of the human oxidative burst oxidase (gp91^{phox}). *Plant J* **14** (3), 365-370.
- Torres, M. A., Jones, J. D. G., Dangl, J. L. (2006) Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiol* **141**, 373-378.
- Trachootham, D., Lu, W., Ogasawara, M. A., Rivera-Del Valle, N., Huang, P. (2008) Redox regulation of cell survival. *Antioxid Redox Signal* **10**, 1343-1374.
- Tripathi, S. K., Tuteja, N. (2007) Integrated signaling in flower senescence. *Plant Signal Behav* **2** (6), 437-445.
- Tsuji, H., Nakazono, M., Saisho, D., Tsutsumi, N., Hirai, A., (2000) Transcript levels of the nuclear-encoded respiratory genes in rice decrease by oxygen deprivation: evidence for involvement of calcium in expression of the alternative oxidase 1a gene. *FEBS Lett* **471**, 201-204.
- Tsujimoto, Y., Nakagawa, T., Shimizu, S. (2006) Mitochondrial membrane permeability transition and cell death. *Biochim Biophys Acta* **1757**, 1297-1300.
- Tuteja, N. (2003) Plant DNA helicases: the long unwinding road. *J Exp Bot* **54** (391), 2201-2214.
- Tuteja, N., Mahajan, S. (2007) Calcium signalling network in plants. *Plant Signal Behav* **2**, 79-85.
- Ulmasov, T., Murfett, J., Hagen, G., Guilfoyle, T. J. (1997) Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* **9**, 1963-1971.

- Unsel, M., Marienfeld, J.R., Brandt, P., and Brennicke, A. (1997). The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366,924 nucleotides. *Nat Genet* **15**, 57-61.
- Van Aken, O., Zhang, B., Carrie, C., Uggalla, V., Paynter, E., Giraud, E., Whelan, J. (2009) Defining the mitochondrial stress response in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant* **2** (6), 1310-1324.
- Van Aken, O., Giraud, E., Clifton, R., Whelan, J. (2009) Alternative oxidase: a target and regulator of stress responses. *Physiol Plant* **137** (4), 354-361.
- Van Aken, O., Pecenkova, T., van de Cotte, B., De Rycke, R., Eeckhout, D., Fromm, H., De Jaeger, G., Witter, E., Beemster, G. T. S., Inzé, D., Van Breusegem, F. (2007) Mitochondrial type-I prohibitins of *Arabidopsis thaliana* are required for supporting proficient meristem development. *Plant J* **52**, 850-864.
- Van Aken, O., Whelan, J., Van Breusegem, F. (2010) Prohibitins: mitochondrial partners in development and stress response. *Trends Plant Sci* **15** (5), 275-282.
- Van der Graaf, E., Schwacke, R., Schneider, A., Desimone, M., Flügge, U., Kunze, R. (2006) Transcription analysis of *Arabidopsis* membrane transporters and hormone pathways during developmental and induced leaf senescence. *Plant Physiol* **141**, 776-792.
- Van Dongen, J. T., Fröhlich, A., Ramírez-Aguilar, S. J., Schauer, N., Fernie, A. R., Erban, A., Kopka, J., Langer, A., Geigenberger, P. (2009) Transcript and metabolite profiling of the adaptive response to mild decreases in oxygen concentration in the roots of *Arabidopsis* plants. *Ann Bot* **103** (2), 269-280.
- Vanderbeld, B., Snedden, W. A. (2007) Developmental and stimulus-induced expression patterns of *Arabidopsis* calmodulin-like genes CML37, CML38 and CML39. *Plant Mol Biol* **64**, 683-697.
- Van Gestel, K., Köhler, R. H., Verbelen, J-P. (2002) Plant mitochondria move on F-actin but their positioning in the cortical cytoplasm depends on both F-actin and microtubules. *J Exp Bot* **53**, 659-667.
- Vanlerberghe, G. C., McIntosh, L. (1996) Signals regulating the expression of the nuclear gene encoding alternative oxidase of plant mitochondria. *Plant Physiol* **111**, 589-595.
- Vanlerberghe, G.C., Yip, J. Y. H., Parsons, H. L. (1999) *In organello* and *in vivo* evidence of the importance of the regulatory sulfhydryl/disulfide system and pyruvate for alternative oxidase activity in tobacco. *Plant Physiol* **121**, 793-803.
- Vanlerberghe, G.C., Robson, C.A., Yip, J.Y. (2002) Induction of mitochondrial alternative oxidase in response to a cell signal pathway down-regulating the cytochrome pathway prevents programmed cell death. *Plant Physiol* **129**, 1829-1842.
- Van Montfort, R. L., Slingsby, C., Vierling, E. (2002) Structure and function of the small heat shock protein/alpha-crystallin family of molecular chaperones. *Adv Protein Chem* **59**, 105-156.

- Vartapetian, B., Andreeva, I. N., Generozova, I. P., Polyakova, L. I., Maslova, I. P., Dolgikh, Y. I., Stepanova, A. Y. (2003) Functional electron microscopy in studies of plant response and adaption to anaerobic stress. *Ann Bot* **91**, 155-172.
- Vlad, F., Turk, B. E., Peynot, P., Leung, J., Merlot, S. (2008) A versatile strategy to define the phosphorylation preferences of plant protein kinases and screen for putative substrates. *Plant J* **55**, 104-117.
- Vranová, E., Inzé, D., Van Breusegem, F., 2002. Signal transduction during oxidative stress. *J Exp Bot* **53**, 1227-1236.
- Wagner, M., Price, G., Rothstein, R. (2006) The absence of Top3 reveals an interaction between the Sgs1 and Pif1 DNA helicases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **174**, 555-575.
- Wagner, U., Edwards, R., Dixon, D. P., Mauch, F. (2002) Probing the diversity of the *Arabidopsis* glutathione *S*-transferase gene family. *Plant Mol Biol* **49**, 515-532.
- Wang, H., Boavida, L. C., Ron, M., McCormick, S. (2008) Truncation of a protein disulfide isomerase, PDIL2-1, delays embryo sac maturation and disrupts pollen tube guidance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **20**, 3300-3311.
- Wang, K. L. C., Li, H., Ecker, J. R. (2002) Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell*, S131-S151.
- Wang, Y., Chen, C., Loake, G. J., Chu, C. (2010) Nitric oxide: promoter or suppressor of programmed cell death? *Protein Cell* **1** (2), 133-142.
- Waters, E. R., Aebermann, B. D., Sanders-Reed, Z. (2008) Comparative analysis of the small heat shock proteins in three angiosperm genomes identifies new subfamilies and reveals diverse evolutionary patterns. *Cell Stress Chaperones* **13**, 127-142.
- Waypa, G. B., Marks, J. D., Mack, M. M., Boroboun, C., Mungai, P. T., Schumacker, P. T. (2002). Mitochondrial reactive oxygen species trigger calcium increases during hypoxia in pulmonary arterial myocytes. *Circ Res* **91**, 719-729.
- Wehmeyer, N., Hernandez, L. D., Finkelstein, R. R., Vierling, E. (1996) Synthesis of small heat-shock proteins is part of the developmental program of late seed maturation. *Plant Physiol* **112**, 747-757.
- Wehmeyer, N., Vierling, E. (2000) The expression of small heat shock proteins in seeds responds to discrete developmental signals and suggests a general protective role in desiccation tolerance. *Plant Physiol* **122**, 1099-1108.
- Wilkinson, B., Gilbert, H. F. (2004) Protein disulfide isomerase. *Biochim Biophys Acta* **1699**, 35-44.
- Wilkinson, S., Davies, W. J. (2010) Drought, ozone, ABA and ethylene: new insights from cell to plant to community. *Plant Cell Environ* **33**, 510-525...

- Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G. R., Provart, N. J. (2007) An “Electronic Fluorescent Pictograph” Browser for Exploring and Analyzing Large-Scale Biological Data Sets. *PLoS One* **2** (8), e718.
- Woo, H. R., Kim, J. H., Nam, H. G., Lim, P. O. (2004) The delayed leaf senescence mutants of *Arabidopsis*, *ore1*, *ore3*, and *ore9* are tolerant to oxidative stress. *Plant Cell Physiol* **45** (7), 923-932.
- Wu, R. S. S. (2002) Hypoxia: from molecular responses to ecosystem responses. *Mar Pollut Bull* **45**, 35-45.
- Yamasaki, H., Shimoji, H., Ohshiro, Y., Sakihama, Y. (2001) Inhibitory effects of nitric oxide on oxidative phosphorylation in plant mitochondria. *Nitric Oxide* **5**, 261-270.
- Yang, T., Poovaiah, B. W. (2002) Hydrogen peroxide homeostasis: Activation of plant catalase by calcium-calmodulin. *PNAS* **99** (6), 4097-4102.
- Yao, N., Tada, Y., Sakamoto, M., Nakayashiki, H., Park, P., Tosa, Y., Madama, S. (2002) Mitochondrial oxidative burst involved in apoptotic response in oats. *Plant J* **30** (5), 567-579.
- Yao, N., Eisfelder, B. J., Marvin, J., Greenberg, J. T. (2004) The mitochondrion – an organelle commonly involved in programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **40**, 596-610.
- Ye, Z., Rodriguez, R., Tran, A., Hoang, H., de los Santos, D., Brown, S., Vellanoweth, R. L. (2000) The developmental transition to flowering represses ascorbate peroxidase activity and induces enzymatic lipid peroxidation in leaf tissue in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci* **158**, 115-127.
- Yenowski, R. L., Fine, M., Pellow, J. W. (1990) A mutant neomycin phosphotransferase II gene reduces the resistance of transformants to antibiotic selection pressure. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**, 3435-3439.
- Yin, C., Richter, U., Börner, T., Weihe, A. (2010) Evolution of plant phage-type RNA polymerases: the genome of the basal angiosperm *Nuphar advena* encodes two mitochondrial and one plastid phage-type RNA polymerases. *BMC Evol Biol* **6** (10), 379-389.
- Yoshinaga, K., Arimura, S., Hirata, A., Niwa, Y., Yun, D. J., Tsutsumi, N., Uchimiya, H., Kawai-Yamada, M. (2005a) Mammalian Bax initiates plant cell death through organelle destruction. *Plant Cell Rep* **24**, 408-417.
- Yoshinaga, K., Arimura, S., Niwa, Y., Tsutsumi, N., Uchimiya, H., Kawai-Yamada, M. (2005b) Mitochondrial behaviour in the early stages of ROS stress leading to cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Ann Bot* **96**, 337-342.
- Yoshinaga, K., Fujimoto, M., Arimura, S., Tsutsumi, N., Uchimiya, H., Kawai-Yamada, M. (2006) The mitochondrial fission regulator DRP3B does not regulate cell death in plants. *Ann Bot* **97**, 1145-1149.

- Young, L. W., Wilen, R. W., Bonham-Smith, P. C. (2004) High temperature stress of *Brassica napus* during flowering reduces micro- and megagametophyte fertility, induces fruit abortion, and disrupts seed production. *J Exp Bot* **55** (396), 485-495.
- Yuan, X., Deng, K. Q., Zhao, X. Y., Wu, X. J., Qin, Y. Z., Tang, D.Y., Liu, X. M. (2007) A calcium-dependent protein kinase is involved in plant hormone signal transduction in *Arabidopsis*. *Zhi Wu Sheng Li Yu Fen Zi Sheng Wu Xue Xue Bao* **33** (3), 227-234.
- Yukari, A., Barkan, A. (2006) *Arabidopsis* orthologs of maize chloroplast splicing factors promote splicing of orthologous and species-specific group II introns. *Plant Physiol* **142**, 1656-1663.
- Zarkovic, J., Anderson, S. L., Rhoads, D. M. (2005) A reporter gene system used to study developmental expression of alternative oxidase and isolate mitochondrial retrograde regulation mutants in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* **57**, 871-888.
- Zdobnov, E. M, Apweiler, R. (2001) InterProScan - an integration platform for the signature-recognition methods in InterPro. *Bioinformatics* **17** (9), 847-848.
- Zeevaart, J. A. D., Creelman, R. A. (1988) Metabolism and physiology of abscisic acid. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **39**, 439-473.
- Zhang, L., Xing, D. (2008) Methyl jasmonate induces production of reactive oxygen species and alterations in mitochondrial dynamics that precede photosynthetic dysfunction and subsequent cell death. *Plant Cell Physiol* **49** (7), 1092-1111.
- Zhang, X., Hu, J (2008) Two small protein families, DYNAMIN-RELATED PROTEIN3 and FISSION1, are required for peroxisome fission in *Arabidopsis*. *Plant J* **57**, 146-159.
- Zhang, X., Hu, J (2008) FISSION1A and FISSION1B proteins mediate the fission of peroxisomes and mitochondria in *Arabidopsis*. *Mol Plant* **1** (6), 1036-1047.
- Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L., Gruissem, W. (2004) GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol* **136**, 2621-2632.
- Zinn, K. E., Tunc-Ozdemir, M., Harper, J. F. (2010) Temperature stress and plant sexual reproduction: uncovering the weakest links. *J Exp Bot* **61** (7), 1959-1968.

A

Anhang

Tabelle A1: Liste der hypoxieregulierten nukleären Gene mitochondrial lokalisierter Proteine.

Sieben Tage alte Keimlinge wurden für 2 h, 9 h und 12 h bei Schwachlicht mit Argon begast (Branco-Price et al., 2005; Branco-Price et al., 2008). Als hypoxiebeeinflusst wurden nach einer Analyse der Daten mit dem Programm *Genevestigator* (Zimmermann et al., 2004) alle Gene definiert, deren Log2-Expressionsrate im Vergleich zur normoxischen Kontrolle kleiner als -1 und größer als 1 war. Die Abkürzungen für das mitochondriales Glykoprotein der MAM33 Familie (ATGP-mito), die 2,3-bisphosphoglyceratunabhängige Phosphoglyceratmutase (ATPGAM-i-mito), das 26.3 kDa Hitzeschockprotein der Klasse I (ATHSP26.3-mito), die putative Helikase (PHL) und für das 22 kDa große Hitzeschockprotein (ATHSP22-mito) wurden in dieser Arbeit erstellt. Alle anderen Abkürzungen sowie Beschreibungen sind der Datenbank TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>) entnommen. Erhöhte Werte sind rot und verminderte Werte schwarz hinterlegt.

Sonde	AGI-Nr.	Log2 Signalrate (2 h Hypoxie)	Log2 Signalrate (9 h Hypoxie)	Log2 Signalrate (12 h Hypoxie)	Beschreibung	Abkürzung
249830_at	At5g23300	-0,16	-1,5	-3,23	Dihydroorotatoxidase	PYRD
255158_s_at	At4g07800	-2,09	2,66	-3,15	hypothetisches Protein, DNA-Helikase, keine Importsequenz	F5K24.3
257164_at	At3g24320	-0,43	-1,18	-2,39	Mismatch-Bindeprotein, unterstützt Rearrangements des mitochondrialen Genoms	ATMSH1
248838_at	At5g46800	0,09	0,12	-2,2	carnitin/acylcarnitintranslokaseartiges Protein	SOUFFLE
260900_s_at	At1g21400	0,49	-0,38	-2,16	verzweigtetige Alpha-ketoaziddehydrogenase	F24J8.4
247746_at	At5g58970	-0,09	-1,01	-2,05	entkoppelndes Protein	ATUCP2
257213_at	At3g15020	0	-1,44	-1,95	mitochondriale NAD-abhängige Malatdehydrogenase	MMDH2
249426_at	At5g39840	-0,5	-2,11	-1,89	putative RNA-Helikase	K13H13.20
245063_at	At2g39795	-0,37	-1,82	-1,84	mitochondriales Glykoprotein der MAM33 Familie	ATGP-mito
248065_at	At5g55580	0,31	0,31	-1,84	mitochondrialer Transkriptionsterminationsfaktor	MDF20.2
258454_at	At3g22300	-0,25	-1,76	-1,82	putatives 40S ribosomales Protein S10	RPS10
257792_at	At3g27080	-0,14	-1,25	-1,72	Translokase der äußeren mitochondrialen Membran 20	TOM20
265329_at	At2g18450	0,3	-0,96	-1,73	putative Succinatdehydrogenase-flavoproteinuntereinheit	SDH1-2
250554_at	At5g07900	-0,97	-1,9	-1,69	mitochondrialer Transkriptionsterminationsfaktor	F13G24.100

Tabelle A1: Liste der in ihrer Expression durch Hypoxie regulierten Gene mitochondrial lokalisierte Proteine (Fortsetzung).

Sonde	AGI-Nr.	Log2 Signalrate (2 h Hypoxie)	Log2 Signalrate (9 h Hypoxie)	Log2 Signalrate (12 h Hypoxie)	Beschreibung	Abkürzung
264668_at	At1g09780	-0,66	-1,13	-1,67	2,3-bisphosphoglyceratunabhängige Phosphoglyceratmutase	ATPGAM-i-mito
255142_at	At4g08390	-0,27	-2,24	-1,63	Ascorbatperoxidase	SAPX
257131_at	At3g20240	-1,14	-2,52	-1,61	mitochondriales Transportprotein	MAL21-26
254904_at	At4g11160	-0,81	-2,31	-1,57	putativer Translationsinitiationfaktor IF-2	T22B4.140
259994_at	At1g68130	-0,23	-1,18	-1,5	putatives C2H2-Zinkfingerprotein, Transkriptionsfaktor	ATIDD14
260615_at	At1g53240	-0,09	-1,09	1,53	mitochondriale NAD-abhängige Malatdehydrogenase	MMDH1
264730_at	At1g62090	-0,72	-2,87	-1,5	mitochondrialer Transkriptionsterminationsfaktor	F19K23.4
247552_at	At5g60920	-0,68	-1,11	-1,43	Phytochelatsynthetaseartiges Protein	COBRA
266047_at	At2g40800	-0,29	-0,87	-1,42	unbekanntes Protein	T7D17.2
255594_at	At4g01660	-0,98	-1,28	-1,41	putativer ABCTransporter	ATABC1
256765_at	At3g22200	-0,55	-0,91	-1,41	Aminotransferase	GABA-T
246528_at	At5g15640	-0,8	-1,81	-1,37	putatives mitochondriales Transportprotein	F18F8.20
252479_at	At3g46560	-0,09	-1,52	-1,35	Translokase der inneren mitochondrialen Membran 9	TIM9
248201_at	At5g54180	-0,43	-1,08	-1,33	mitochondrialer Transkriptionsterminationsfaktor	PTAC15
249343_at	At5g40650	-0,24	-1,04	-1,33	Succinatdehydrogenase-Eisen-Protein	SDH2-2
249424_s_at	At5g39800	0,18	-1,05	-1,32	Mitochondriales ribosomales Protein	MKM21.12
264093_at	At1g79220	-0,85	-1,59	-1,31	mitochondrialer Transkriptionsterminationsfaktor	YUP8H12R.18
250206_at	At5g14040	-0,56	-1,56	-1,31	mitochondrialer Phosphattranslokator	PTH3-1

Tabelle A1: Liste der in ihrer Expression durch Hypoxie regulierten Gene mitochondrial lokalisierter Proteine (Fortsetzung).

Sonde	AGI-Nr.	Log2 Signalrate (2 h Hypoxie)	Log2 Signalrate (9 h Hypoxie)	Log2 Signalrate (12 h Hypoxie)	Beschreibung	Abkürzung
247498_at	At5g61810	-0,83	-0,82	-1,25	mitochondriales kalziumionenbindendes Transportprotein	MAC9.1
265041_at	At1g04070	-0,71	-0,73	-1,24	Untereinheit der Translokase der äußeren mitochondrialen Membran	ATTOM22-1
251573_at	At3g58140	-0,22	-0,93	-1,22	Phenylalanin-tRNA-Synthetase	F9D24.50
251685_at	At3g56430	-0,35	-1,02	-1,21	putatives Protein	T5P19.80
265188_at	At1g23800	-0,62	-1,98	-1,2	Aldehyddehydrogenase	ALDH2B
267368_at	At2g44350	-0,17	-1,09	-1,2	Citratsynthase	ATCS
252839_at	At3g42100	-0,94	0,28	-1,19	putatives Protein, transposables Element	F4M19.60
253028_at	At4g38160	-0,31	-0,94	-1,18	mitochondrialer Transkriptionsterminationsfaktor	PDE191
267151_at	At2g30970	-0,12	-0,57	-1,14	Aspartataminotransferase	AAT1
245854_at	At5g13490	0,3	-1,42	-1,13	ADP/ATP-Transporter	AAC2
249224_at	At5g42130	-0,23	-0,74	-1,11	mitochondriales Transportprotein	MJC20.24
253549_at	At4g30930	-0,4	-1,35	-1,08	ribosomales Protein	NFD1
259146_at	At3g10370	-0,64	-1,31	-1,07	putative Glycerol-3-phosphatdehydrogenase	SDP6
250762_at	At5g05990	-0,19	-1,4	-1,04	Protein der mitochondrialen Glycoprotein-Familie MAM33	K18J17.19
266225_at	At2g28900	0,49	1,31	-1,02	putatives Membrankanaleprotein	ATOEP16
249076_at	At5g43970	0,1	-0,56	-1,01	Untereinheit der Translokase der äußeren mitochondrialen Membran	ATTOM22-V
264000_at	At2g22500	-0,13	-0,22	-1	putatives mitochondriales Dicarboxylattransportprotein	DIC1
262148_at	At1g52560	1,81	4,75	5,55	26.3 kDa Hitzeschockprotein der Klasse I, reagiert auf H ₂ O ₂	ATHSP26.3-mito

Tabelle A1: Liste der in ihrer Expression durch Hypoxie regulierten Gene mitochondrial lokalisierter Proteine (Fortsetzung).

Sonde	AGI-Nr.	Log2 Signalrate (2 h Hypoxie)	Log2 Signalrate (9 h Hypoxie)	Log2 Signalrate (12 h Hypoxie)	Beschreibung	Abkürzung
263342_at	At2g05080	-0,94	-0,88	4,98	putative Helikase	PHL
254059_at	At4g25200	1,74	5,44	4,93	mitochondrial lokalisiertes kleines Hitzeschockprotein	ATHSP23.6-mito
259879_at	At1g76650	6,45	7,21	4,78	kalziumionenbindendes calmodulinartiges Protein,	CML38
252334_at	At3g48850	0,31	1,43	3,51	mitochondrialer Phosphattransporter	PHT3-2
258451_at	At3g22360	1,36	2,36	3,36	Isoform 1b der Alternative Oxidase	AOX1b
256987_at	At3g28560	-0,1	0,4	2,8	ATPase	MZN14.3
246854_at	At5g26200	2,7	1,71	2,69	mitochondriales Transportprotein	F9D12.12
262995_s_at	At1g54430	1,97	-0,08	2,56	mTERF	F20D21.25
248434_at	At5g51440	2,33	3,63	2,52	mitochondriales Hitzeschockprotein, 22 kDa	ATHSP22-mito
255222_at	At4g05340	-2,33	-0,66	2,39	putatives Protein, mitochondriale ATPase	C6L9.20
252131_at	At3g50930	1,06	1,53	1,92	BCS1 proteinartig	BCS1
258452_at	At3g22370	1,15	2,96	1,82	Isoform 1a der Alternative Oxidase	AOX1a
260706_at	At1g32350	0,74	1,99	1,78	Isoform 1d der Alternative Oxidase	AOX1d
252228_at	At3g49920	-0,01	0,59	1,69	Anionenkanal	ATVDAC5

Tabelle A2: Expressionsprofile der in 3.2.1.2 identifizierten sieben hypoxiebeeinflussten Gene bei weiteren abiotischen Stressformen.

Die Daten wurden mit dem Programm *Genevestigator* (Zimmermann et al., 2004) ermittelt. Die Pflanzen waren zum Zeitpunkt der Experimente 16 Tage alt. Analysen bezüglich einer frühen Stressantwort erfolgten nach 0, 5 h, 1 h und 3 h Inkubation. Bei den Untersuchungen einer späten Stressantwort betrug die Inkubationszeit 6 h, 12 h und 24 h. Die Grenze für eine erhöhte bzw. verminderte Expression wurde bei einer log2-Signalarate von 1 bzw. -1 festgelegt. Erhöhte Werte sind rot und verminderte Werte schwarz hinterlegt.

Stressform	Gewebe (16 Tage alt)	ATHSP26.3-mito, At1g52560	ATIDD14, At1g68130	CML38, At1g76650	PHL, At2g05080	AOX1a, At3g22370	ATHSP23.6-mito, At4g25200	ATHSP22-mito, At5g51440
oxidativ, frühe Antwort	Wurzel	0,3	-0,05	-0,04	0,47	-0,07	0,41	-0,07
oxidativ, späte Antwort	Wurzel	2,07	0,22	0,41	-2,29	0,62	1,88	0,98
oxidativ, frühe Antwort	Rosette	-1	-0,07	-0,35	-1,02	-0,22	-0,37	-1,59
oxidativ, späte Antwort	Rosette	4,62	-0,12	1,46	-0,75	1	3,38	3,02
Salz, frühe Antwort	Wurzel	0,54	0,18	0,19	0,53	1,94	-0,44	0,93
Salz, späte Antwort	Wurzel	3,94	-0,75	1,2	0,82	3,65	2,95	2,95
Salz, frühe Antwort	Rosette	2,02	-0,14	0,12	-2,1	0,49	-1,16	-1,14
Salz, späte Antwort	Rosette	4,74	-0,85	0,53	-1,37	1,17	-0,89	0,99
Hitze	Wurzel	6,35	-0,27	-3,44	0,68	0,56	6,17	4,55
Hitze	Rosette	9,95	-0,55	-1,32	-0,31	0,56	8,34	6,53
Kälte, frühe Antwort	Wurzel	-1,25	0,1	-0,75	0,74	-0,45	-1,31	-0,13
Kälte, späte Antwort	Wurzel	0,63	0,07	2,28	0,07	0,61	-1,89	-0,93
Kälte, frühe Antwort	Rosette	-0,69	0,51	4,83	-0,94	-0,36	-0,29	0,09
Kälte, späte Antwort	Rosette	0,16	-0,93	5,73	-0,78	1,41	-0,26	-0,08
Verwundung, frühe Antwort	Rosette	0,74	-0,4	4,13	-0,79	0,22	-0,75	0,25
Verwundung, späte Antwort	Rosette	1,77	-0,27	1,46	-0,14	-0,02	-0,66	0,81
Verwundung, frühe Antwort	Wurzel	-0,27	-0,24	-0,76	0,78	-0,04	-0,22	-0,08
Verwundung, späte Antwort	Wurzel	1,96	-0,27	0,72	0,89	0,39	2,32	0,75
osmotisch, frühe Antwort	Wurzel	0,99	0,16	0,25	-0,42	0,69	-0,36	-0,37
osmotisch, späte Antwort	Wurzel	3,86	-0,12	1,66	0,2	1,03	2,84	0,6
osmotisch, frühe Antwort	Rosette	0,82	-0,31	2,31	-0,59	0,7	-0,8	0,18
osmotisch, späte Antwort	Rosette	5,5	-1,97	2,78	-1,76	1,8	-0,33	-0,11
Trockenheit, frühe Antwort	Wurzel	0,28	0	0,52	-0,13	0,15	0,52	-0,07
Trockenheit, späte Antwort	Wurzel	0,25	0,18	-0,54	0,16	0,2	0,05	-0,18
Trockenheit, frühe Antwort	Rosette	1,43	-0,02	2,46	-0,02	0,57	-1,27	-0,86
Trockenheit, späte Antwort	Rosette	0,87	-0,19	0,68	-1,33	0,13	-0,21	-0,07

Tabelle A3: Beeinflussung durch Hypoxie und subzelluläre Lokalisation der 34 kalziumabhängigen Proteinkinasen aus *A. thaliana*.

Sieben Tage alte Keimlinge wurden bei Schwachlicht mit Argon begast (Branco-Price et al., 2005; Branco-Price et al., 2008). Als hypoxiebeeinflusst wurden nach einer Analyse der Daten mit dem Programm *Genevestigator* (Zimmermann et al., 2004) alle Gene definiert, deren Log2-Expressionsrate im Vergleich zur normoxischen Kontrolle kleiner als -1 und größer als 1 war. Erhöhte Werte sind rot, verminderte Werte schwarz hinterlegt. Die subzelluläre Lokalisation der entsprechenden Proteine wurde, soweit nicht bereits bekannt, mit den Programmen *Predotar* (Small et al., 2004), *MitoprotII* (Claros und Vincens, 1996) und *SubLoc* (Hua und Sun, 2001) bestimmt. Die verwendeten Programme und die jeweiligen Wahrscheinlichkeiten sind in Klammern angegeben.

Protein	AGI-Nr.	Log2 Signalrate (2 h Hypoxie)	Log2 Signalrate (9 h Hypoxie)	Log2 Signalrate (12 h Hypoxie)	Lokalisation
CPK1	At5g04870	-0,2	-0,36	-0,18	Mitochondrien (0,43; <i>MitoprotII</i>) Plastiden (0,31; <i>Predotar</i>) Nukleus (0,56; <i>SubLoc</i>)
CPK2	At3g10660	-0,25	-2,23	-1,04	Mitochondrien (0,26; <i>MitoprotII</i>) Cytosol (0,56; <i>SubLoc</i>)
CPK3	At4g23650	-0,47	-0,39	-0,35	Cytosol, Nukleus (GFP; Damman et al., 2003)
CPK4	At4g09570	0,47	0	-0,77	Cytosol, Nukleus (GFP; Damman et al., 2003)
CPK5	At4g35310	-0,25	-0,32	0,16	Cytosol (0,56; <i>SubLoc</i>) Mitochondrien (0,1; <i>MitoprotII</i>)
CPK6	At2g17290	-0,16	-0,44	-0,31	Cytosol (0,56; <i>SubLoc</i>) Mitochondrien (0,18; <i>MitoprotII</i>)
CPK7	At5g12480	-0,1	-0,69	-0,15	Plasmamembran (GFP; Damman et al., 2003)
CPK8	At5g19450	-0,22	-0,09	0,52	Plasmamembran (GFP; Damman et al., 2003)
CPK9	At3g20410	-0,2	-0,83	-0,02	Plasmamembran (GFP; Damman et al., 2003)
CPK10	At1g18890	0,19	0,01	0,41	Nukleus (0,56; <i>SubLoc</i>)
CPK11	At1g35670	1,12	1,13	-0,17	Cytosol, Nukleus (GFP; Rodriguez Milla et al., 2006)
CPK12	At5g23580	-0,12	0,14	-0,28	Mitochondrien (0,17; <i>MitoprotII</i>) Mitochondrien (0,3; <i>Predotar</i>) Cytosol (0,84; <i>SubLoc</i>)
CPK13	At3g51850	-0,36	-0,12	-0,05	Mitochondrien (0,21; <i>MitoprotII</i>) Cytosol (0,56; <i>SubLoc</i>)
CPK14	At2g41860	-0,06	-0,41	3,74	Mitochondrien (0,21; <i>MitoprotII</i>) Cytosol (0,84; <i>SubLoc</i>)
CPK15	At4g21940	0,58	-1,03	-1,23	Mitochondrien (0,17; <i>MitoprotII</i>) Cytosol (0,56; <i>SubLoc</i>)
CPK16	At2g17890	-2,25	-0,41	-0,27	Plasmamembran (GFP; Damman et al., 2003)
CPK17	At5g12180	-0,14	-0,95	1,64	Plasmamembran (GFP; Myers et al., 2009)

Tabelle A3: Beeinflussung durch Hypoxie und subzelluläre Lokalisation der 34 kalziumabhängigen Proteinkinasen aus *A. thaliana* (Fortsetzung).

Protein	AGI-Nr.	Log2 Signalrate (2 h Hypoxie)	Log2 Signalrate (9 h Hypoxie)	Log2 Signalrate (12 h Hypoxie)	Lokalisation
CPK18	At4g36070	-1,69	3,57	0,41	Mitochondrien (0,6; <i>MitoprotII</i>) Cytosol (0,56; <i>SubLoc</i>)
CPK19	At1g61950	-0,43	0,2	-2,52	Mitochondrien (0,26; <i>MitoprotII</i>) Nukleus (0,74; <i>SubLoc</i>)
CPK20	At2g38910	-0,47	-0,11	0,11	Mitochondrien (0,24; <i>MitoprotII</i>) Nukleus (0,56; <i>SubLoc</i>)
CPK21	At4g04720	0,1	-0,52	-0,47	Plasmamembran (GFP; Damman et al., 2003)
CPK22	At4g04710	0,66	1,15	1,13	Cytosol (GFP; diese Arbeit, siehe 3.3)
CPK23	At4g04740	1,05	1,47	0,33	Plasmamembran (YFP; Geiger et al., 2010)
CPK24	At2g31500	-0,71	-0,04	0,32	Plastiden (0,59; <i>Predotar</i>) Mitochondrien (0,96; <i>MitoprotII</i>) Mitochondrien (0,56; <i>SubLoc</i>)
CPK25	At2g35890	-2,74	1,39	-1	Mitochondrien (0,17; <i>MitoprotII</i>) Nukleus (0,84; <i>SubLoc</i>)
CPK26	At4g38230	-0,71	-0,24	0,11	Mitochondrien (0,32; <i>MitoprotII</i>) Cytosol (0,84; <i>SubLoc</i>)
CPK27	At4g04700	-0,71	-0,04	0,32	Mitochondrien (0,2; <i>MitoprotII</i>) Cytosol (0,84; <i>SubLoc</i>)
CPK28	At5g66210	2,22	2,17	0,97	Plasmamembran (GFP; Damman et al., 2003)
CPK29	At1g76040	0,58	0,33	-0,39	Cytosol, Nukleus (GFP; Koroleva et al., 2005)
CPK30	At1g74740	-1,02	-1,59	-0,04	Apoplast, Plasmamembran (GFP; Yuan et al., 2007)
CPK31	At4g04695	Keine Daten vorhanden	Keine Daten vorhanden	Keine Daten vorhanden	Mitochondrien (0,52; <i>MitoprotII</i>) Cytosol (0,56; <i>SubLoc</i>)
CPK32	At3g57530	1,14	0,91	0,66	Cytosol (0,56; <i>SubLoc</i>)
CPK33	At1g50700	-0,81	-2,16	-3,59	Cytosol (0,74; <i>SubLoc</i>)
CPK34	At5g19360	0,51	-2,01	-1,7	Plasmamembran (GFP; Myers et al., 2009)

Tabelle A4: Expressionsprofile von *CPK22* und *CPK23* bei verschiedenen abiotischen Stressformen.

Die Daten wurden mit dem Programm *Genevestigator* (Zimmermann et al., 2004) ermittelt. Die Pflanzen waren zum Zeitpunkt der Experimente 16 Tage alt. Analysen bezüglich einer frühen Stressantwort erfolgten nach 0, 5 h, 1 h und 3 h Inkubation. Bei den Untersuchungen einer späten Stressantwort betrug die Inkubationszeit 6 h, 12 h und 24 h. In dieser Arbeit wurde die Grenze für eine erhöhte bzw. verminderte Expression bei einer log2-Signalrate von 1 bzw. -1 festgelegt. Verminderte Werte sind schwarz hinterlegt.

Stressform	Gewebe (16 Tage alt)	Log2 Signalrate (<i>CPK22</i>, At4g04710)	Log2 Signalrate (<i>CPK23</i>, At4g04740)
oxidativ, frühe Antwort	Wurzel	0,13	0,03
oxidativ, späte Antwort	Wurzel	0,02	0,2
oxidativ, frühe Antwort	Rosette	0,27	-0,17
oxidativ, späte Antwort	Rosette	0,03	0,13
Salz, frühe Antwort	Wurzel	-0,15	-0,93
Salz, späte Antwort	Wurzel	-0,33	0,15
Salz, frühe Antwort	Rosette	-0,03	-0,1
Salz, späte Antwort	Rosette	-0,28	-0,23
Hitze	Wurzel	-0,21	-0,52
Hitze	Rosette	0,03	-0,55
Kälte, frühe Antwort	Wurzel	-0,09	0,04
Kälte, späte Antwort	Wurzel	-0,04	-1
Kälte, frühe Antwort	Rosette	0,01	-0,07
Kälte, späte Antwort	Rosette	-0,28	-2,03
Verwundung, frühe Antwort	Rosette	-0,03	-0,4
Verwundung, späte Antwort	Rosette	-0,06	-0,23
Verwundung, frühe Antwort	Wurzel	0,18	-0,32
Verwundung, späte Antwort	Wurzel	0,08	-0,07
osmotisch, frühe Antwort	Wurzel	-0,31	-0,5
osmotisch, späte Antwort	Wurzel	-0,45	-0,12
osmotisch, frühe Antwort	Rosette	0,01	-0,2
osmotisch, späte Antwort	Rosette	-0,14	0,4
Trockenheit, frühe Antwort	Wurzel	-0,1	0,06
Trockenheit, späte Antwort	Wurzel	0,03	-0,21
Trockenheit, frühe Antwort	Rosette	-0,04	0,09
Trockenheit, späte Antwort	Rosette	-0,04	0,24

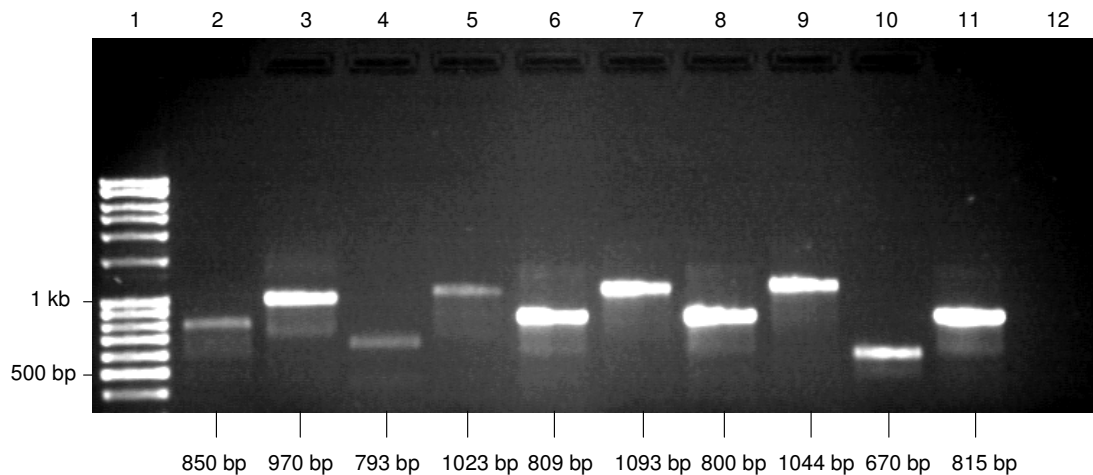


Abbildung A1: Identifizierung von homozygoten T-DNA-Insertionsmutanten.

Gezeigt sind die ihrer Größe nach auf einem 1%igen Agarosegel aufgetragenen PCR-Proben. Pro Linie ist exemplarisch das Ergebnis der Untersuchung einer homozygoten Pflanze zu sehen.

Spur 1: 100 – 5000 bp DNA-Marker

Spur 2: Amplikon (850 bp) des Mutantenallels der Linie SALK_136629 (At4g04710, *cpk22*)

Spur 3: Amplikon des Wildtypallels (970 bp)

Spur 4: Amplikon (793 bp) des Mutantenallels der Linie SALK_007958 (At4g04740, *cpk23*)

Spur 5: Amplikon des Wildtypallels (1023 bp)

Spur 6: Amplikon (809 bp) des Mutantenallels der Linie SALK_049834 (At1g52560, *athsp26.3-mito*)

Spur 7: Amplikon des Wildtypallels (1093 bp)

Spur 8: Amplikon (800 bp) des Mutantenallels der Linie SALK_118536 (At5g51440, *athsp22-mito*)

Spur 9: Amplikon des Wildtypallels (1044 bp)

Spur 10: Amplikon (670 bp) des Mutantenallels der Linie SAIL_210_D11 (At4g27585, *atslp-mito*)

Spur 11: Amplikon des Wildtypallels (815 bp)

Spur 12: H₂O-Kontrolle

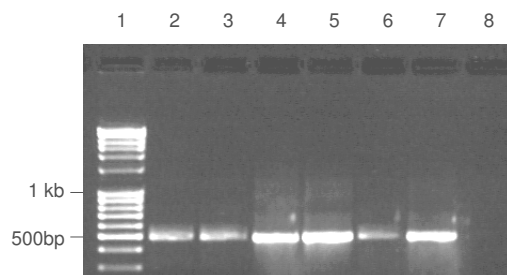


Abbildung A2: Überprüfung der RNA-Integrität.

Gezeigt sind die ihrer Größe nach auf einem 1%igen Agarosegel aufgetragenen RT-PCR-Proben. Spur 1: 100-5000 bp DNA-Marker; Spur 2: *cpk22*; Spur 3: *cpk23*; Spur 4: *athsp26.3-mito*; Spur 5: *athsp22-mito*; Spur 6: *atslp-mito*; Spur 7: Wildtyp; Spur 8: H₂O-Kontrolle. Amplifiziert wurde ein 494 bp großes Fragment des für Actin2 kodierenden Gens (At3g18780).

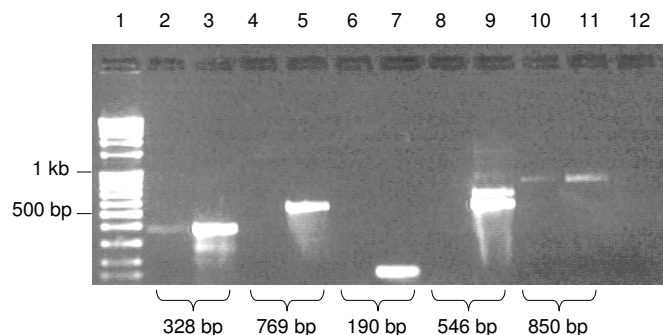


Abbildung A3: Expression von *CPK22*, *CPK23*, *ATHSP26.3-mito*, *ATHSP22-mito*, und *ATSLP-mito* in den korrespondierenden homozygoten T-DNA-Insertionsmutanten und im Wildtyp.

Gezeigt sind die ihrer Größe nach auf einem 1%igen Agarosegel aufgetragenen RT-PCR-Proben. Spur 1: 100-5000 bp DNA-Marker; Spur 2: *cpk22*; Spur 4: *cpk23*; Spur 6: *athsp26.3-mito*; Spur 8: *athsp22-mito*; Spur 10: *atslp-mito*; Spur 3, 5, 7, 9, 11: Wildtyp; Spur 12: H₂O-Kontrolle. Die Größe der jeweiligen Fragmente sind unter den entsprechenden Spuren aufgeführt.

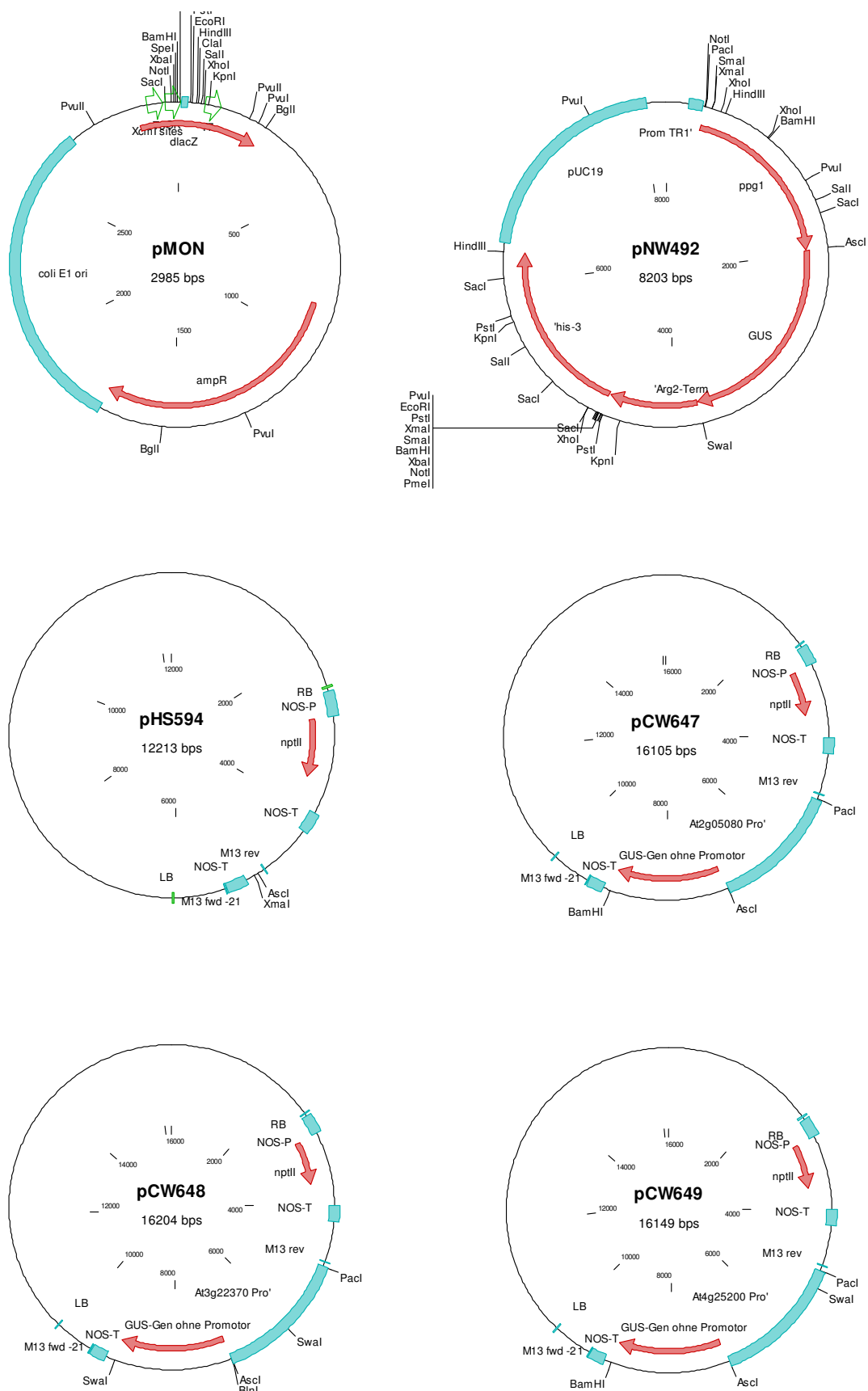


Abbildung A4: Plasmidkarten der in dieser Arbeit erstellten und verwendeten Vektoren.
Genbereiche sind durch rote Pfeile dargestellt, Regionen durch blaue Balken.

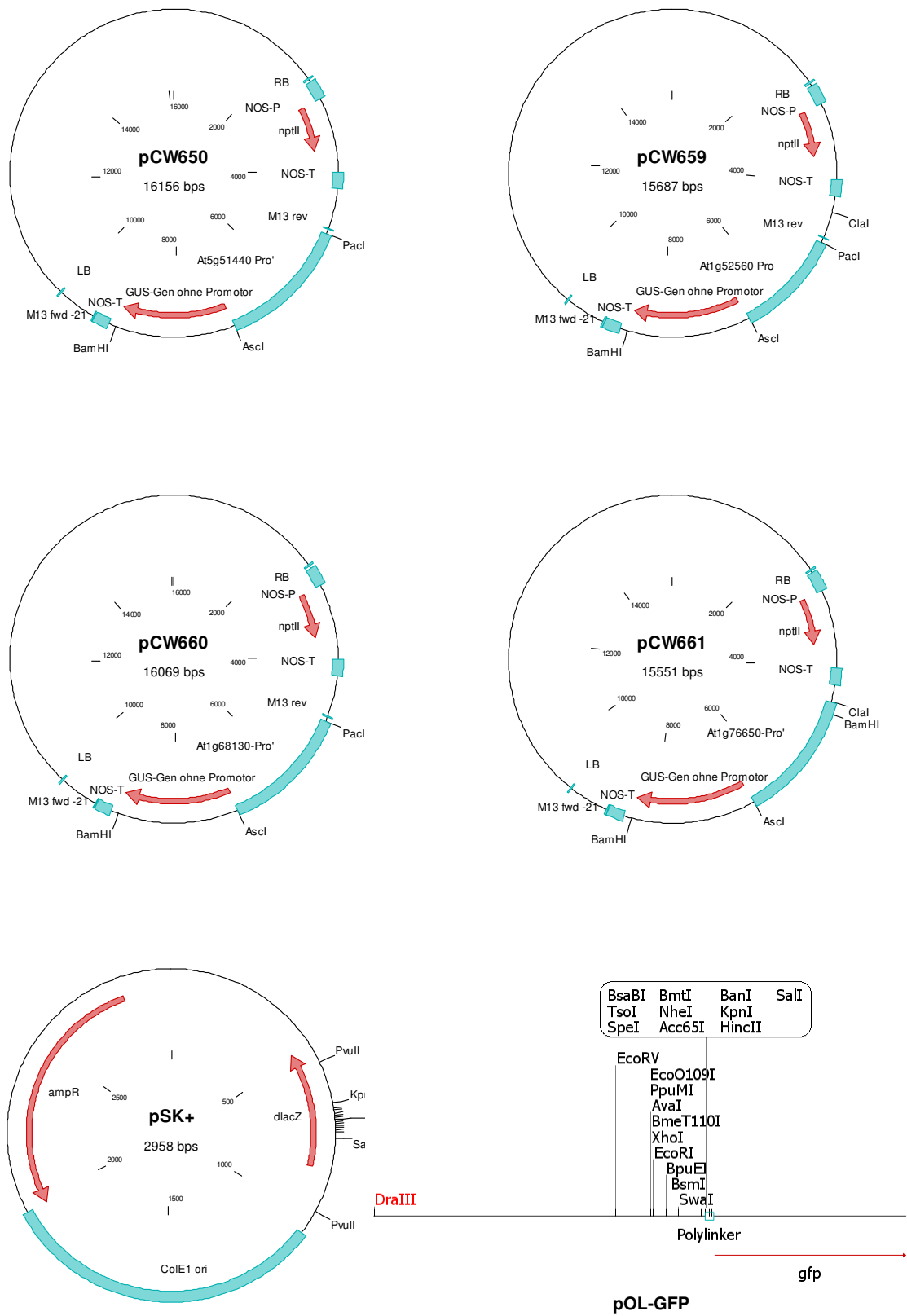


Abbildung A4 (Fortsetzung)

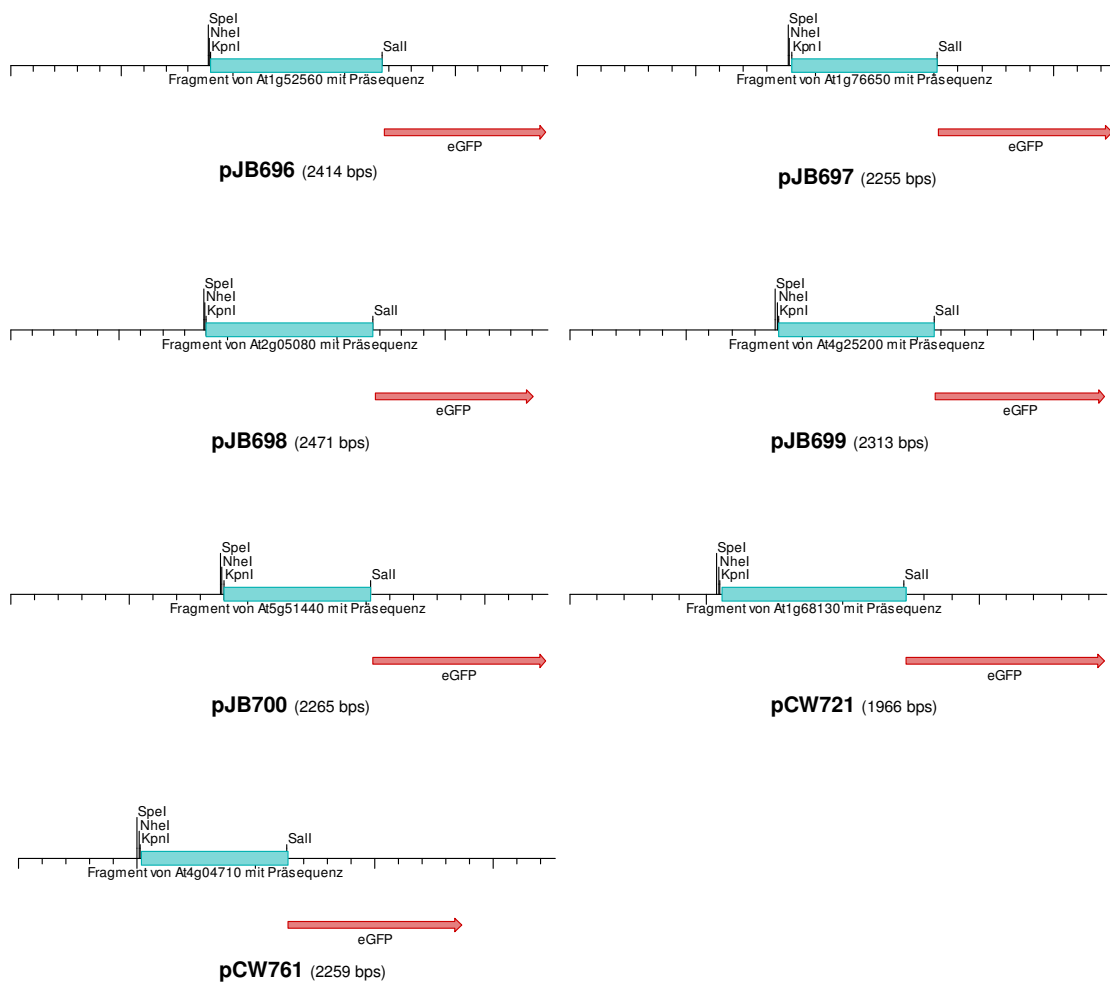


Abbildung A4 (Fortsetzung)

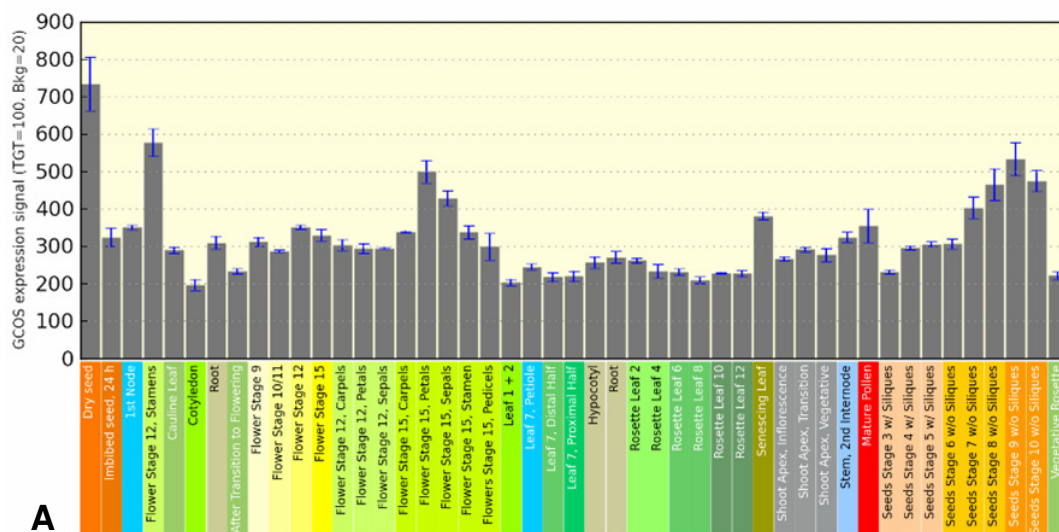


Abbildung A5: Gewebe- und entwicklungsspezifische Expressionsraten von in dieser Arbeit untersuchten Genen hypoxiebeeinflusster Proteine (Fortsetzung).

Die Grafiken wurden unter Verwendung des *Arabidopsis* eFP-Browsers (Winter et al., 2007) erstellt.
A: *BPA1* (At5g16840).

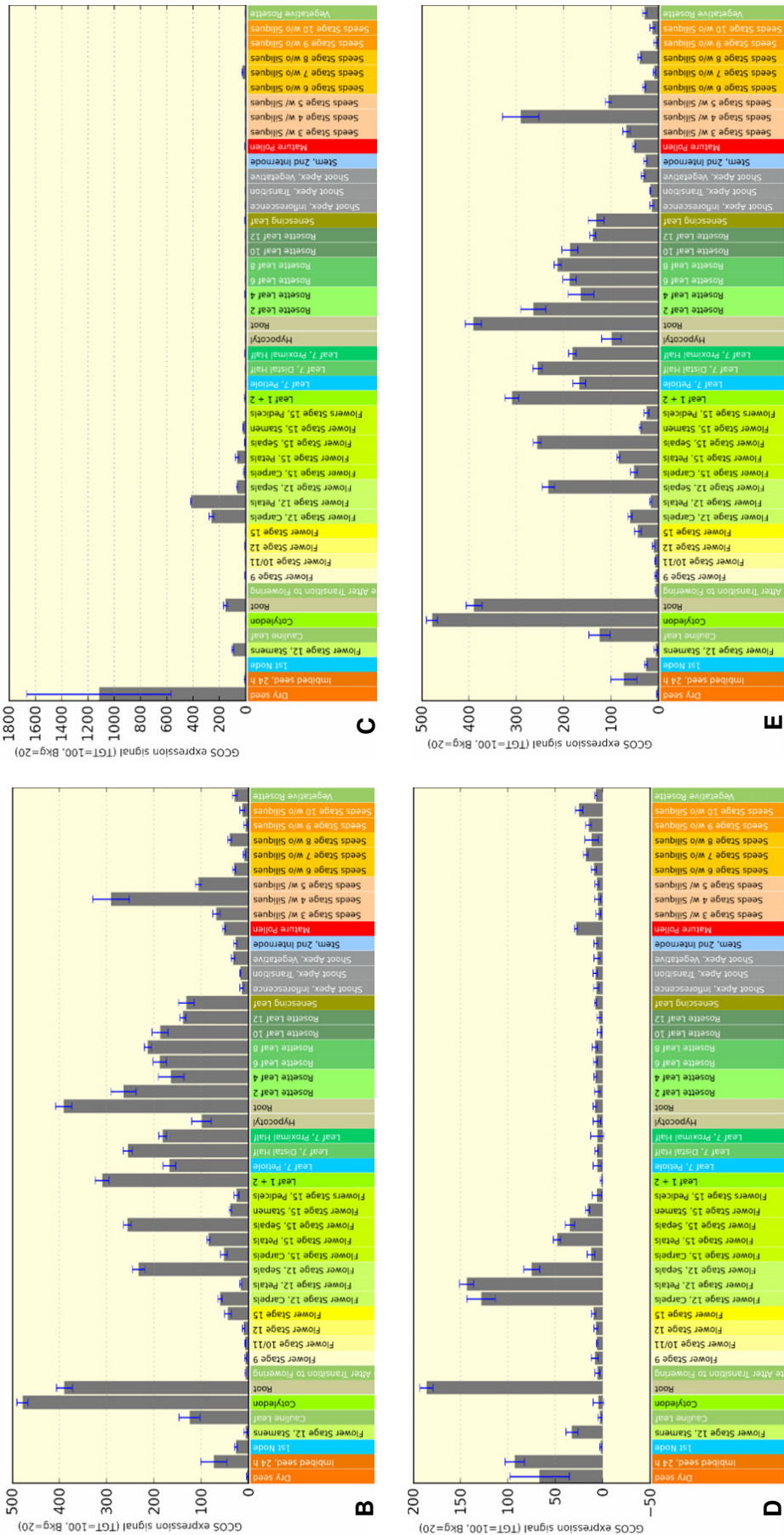


Abbildung A5: Gewebe- und entwicklungsspezifische Expressionsraten hypoxiebeeinflusster Gene (Fortsetzung).
Die Grafiken wurden unter Verwendung des *Arabidopsis* eFP-Browsers (Winter et al., 2007) erstellt. B: *ATHSP26.3-mito* (At1g52560), C: *ATHSP23.6-mito* (At4g25200), D: *ATHSP22-mito* (At5g51440), E: *CML38* (At1g76650).

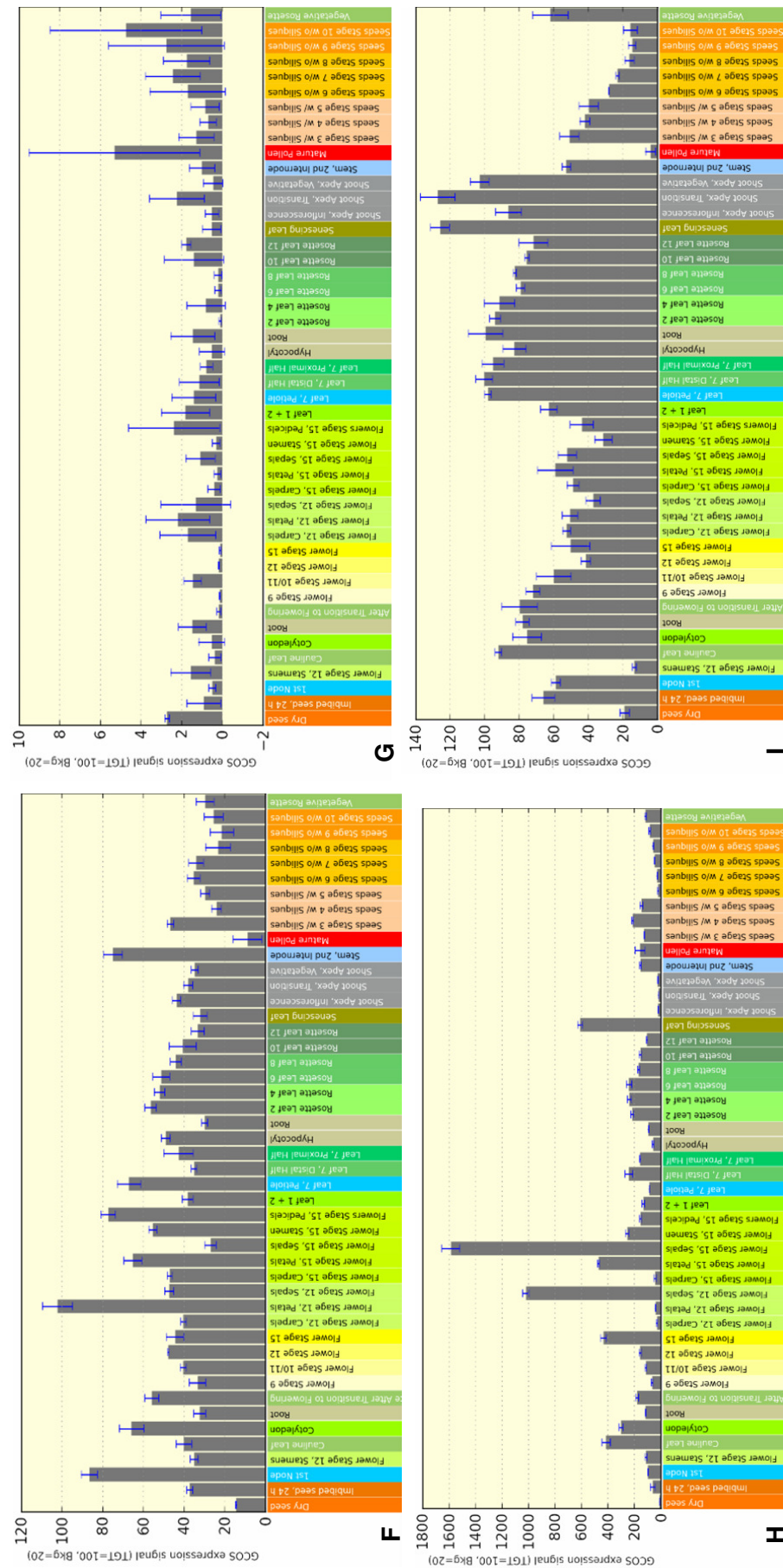


Abbildung A5: Gewebe- und entwicklungsspezifische Expressionsraten hypoxiebeeinflusster Gene (Fortsetzung).

Die Grafiken wurden unter Verwendung des *Arabidopsis* eFP-Browsers (Winter et al., 2007) erstellt. F: *AT1G68130*, G: *PHL* (At2g05080), H: *AOX1a* (At3g22730), I: *CPK22* (At4g04710).



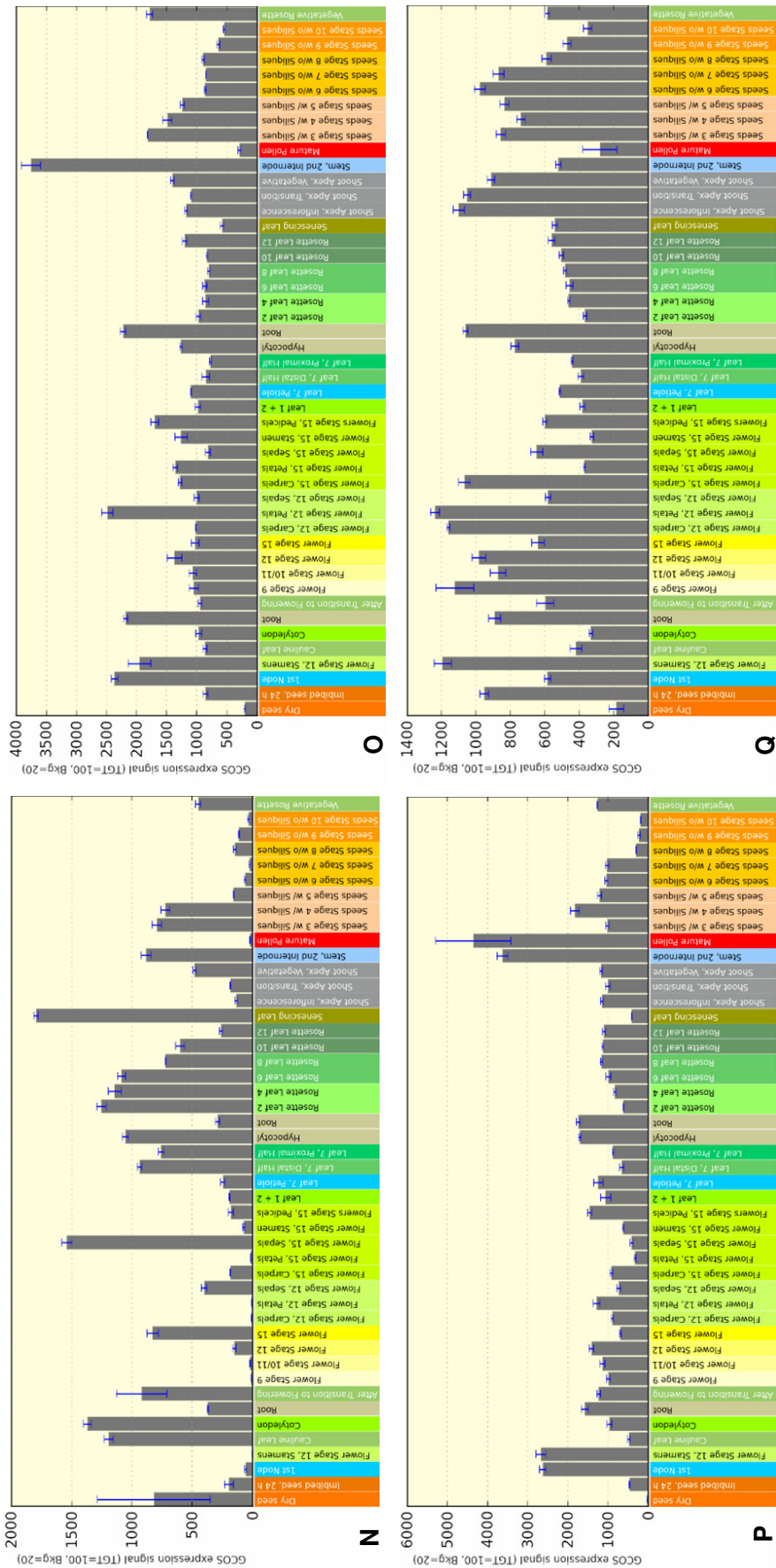


Abbildung A5: Gewebe- und entwicklungspezifische Expressionsraten hypoxiebeeinflusster Gene (Fortsetzung). Die Grafiken wurden unter Verwendung des *Arabidopsis* eFP-Browsers (Winter et al., 2007) erstellt. N: *ATGSTF6* (At1g02930), O: *MAT2* (At4g01850), P: *MAT3* (At2g36880), Q: *PDIL2-1* (At2g47470).

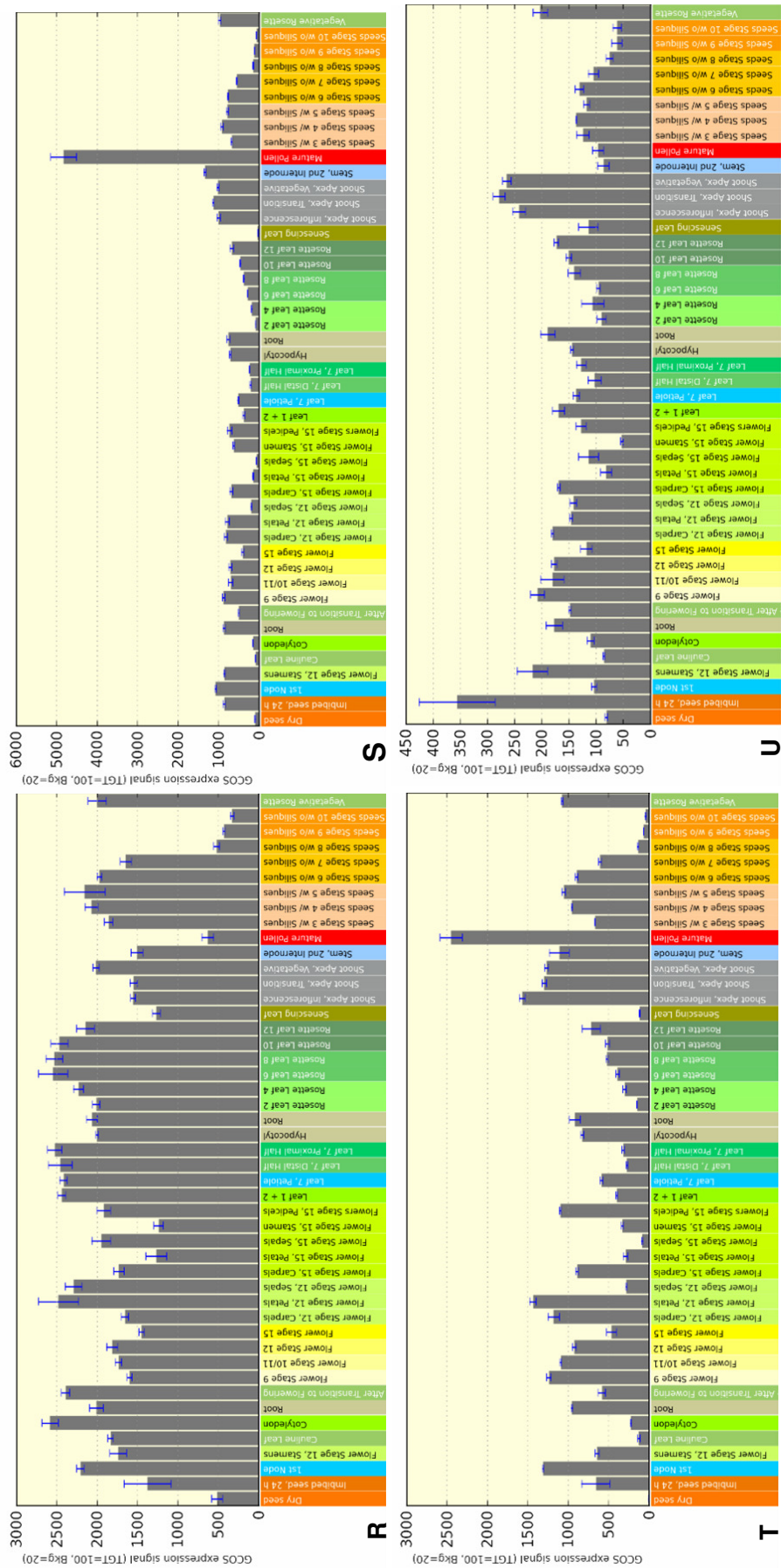


Abbildung A5: Gewebe- und entwicklungspezifische Expressionsraten hypoxiebeeinflusster Gene (Fortsetzung).
Die Grafiken wurden unter Verwendung des *Arabidopsis* eFP-Browsers (Winter et al., 2007) erstellt. R: *ATCTIMC* (At3g55440), S: *TUA2* (At1g50010), T: *TUA4* (At1g04820), U: *MPPa* (At3g16480).

Tagungsbeiträge

Willeke, C., Kempken, F. (2008) Effects of hypoxia on transcriptome of genes encoding mitochondrial proteins of *Arabidopsis thaliana*. Symposium “Intra- and Intercellular Transport and Communication”, Marburg.

Willeke, C., Kempken, F. (2009) Hypoxia and its effects on the mitochondria of *Arabidopsis thaliana*. 22. Tagung Molekularbiologie der Pflanzen, Dabringhausen.

Willeke, C., Kempken, F. (2010) Hypoxia influence on transcriptome and mitochondrial proteome of *Arabidopsis thaliana*. 23. Tagung Molekularbiologie der Pflanzen, Dabringhausen.

Willeke, C., Kempken, F. (2009) Hypoxia effects on transcriptome and mitochondrial proteome of *Arabidopsis thaliana*. 13. Annual Meeting of the German Section of the International Society for Endocytobiology, Berlin.

Willeke, C., Kempken, F. (2009) Hypoxia influence on transcriptome and mitochondrial proteome of *Arabidopsis thaliana*. Leopoldina-Symposium Molecular Genetics of Chloroplasts and Mitochondria”, Berlin.

Danksagung

Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Frank Kempken und der Leiterin des Innovationsfond-Projektes "Anoxie/Hypoxie induzierte Signaltransduktion in Pro- und Eukaryoten", Frau Prof. Dr. Margret Sauter, für ihr Vertrauen welches sie mir mit der Überlassung des Themas entgegengebracht haben. Weiterhin bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. Ruth A. Schmitz-Streit für die Überlassung des Anaerobenzeltes und die Ratschläge zur Durchführung der Hypoxieversuche. Bei Herrn PD Dr. Christoph Plieth bedanke ich mich für die stetige Hilfsbereitschaft und die fachlichen Diskussionen. Darüber hinaus möchte ich mich für die interessante Themenstellung, die materielle Unterstützung und die zahlreichen Anregungen, sowie für das fortdauernde Interesse an dieser Arbeit bedanken.

Außerdem möchte ich mich bei meinen beiden Kollegen in diesem Projekt, Mathias Klode und Anja Büttner, für die vielen anregenden Gespräche und ihre Unterstützung bedanken. Mathias Klode danke ich besonders für die Durchführung der Begasungsversuche.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern der Abteilung für Botanische Genetik und Molekularbiologie, insbesondere Hanna Schmidt für ihre Unterstützung. Krisztina Kollath-Leiß danke ich darüber hinaus für die zahlreichen Stunden am konfokalen Laserscanning-Mikroskop.

Ich danke darüber hinaus Dr. Christoph Gelhaus (Zoologisches Institut, Kiel) für die Anleitung zur Probenvorbereitung für die MALDI-TOF-massenspektrometrischen Analysen und für die Durchführung derselbigen.

Weiterhin bedanke ich mich bei Dr. Renate Dahlke und Dr. Joanna Melonek für ihre hilfreichen Ratschläge bei der Herstellung von *A. thaliana*-Protoplasten und die stets freundliche Unterstützung.

Ein ganz besonderes Dankeschön gilt Ulrike Fohgrub, Lili Chu und Annika Regulin, die mir durch vielfältige Hilfe und aufmunternde Worte beiseite standen.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie danken, die mich in jeder Lebenslage unterstützt und immer hinter mir gestanden hat. Danke, dass ihr immer für mich da seid!

Lebenslauf

Claudia Willeke

Persönliche Daten:

Geburtsdatum	09.12.1979
Geburtsort	Olpe
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung:

1986 – 1990	Katholische Grundschule, Wenden
1990 – 1999	St. Franziskus-Gymnasium, Olpe
	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Weitere Tätigkeiten:

01.09.1999 – 31.08.2000	Freiwilliges Ökologisches Jahr in der Stadtverwaltung Zierenberg
-------------------------	---

Studium:

2000 – 2003	Studium der Biologie (Grundstudium) an der Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg i. Br.
2003 -2004	University of Western Australia, Perth, Australien (Austauschprogramm der Albert-Ludwigs-Universität, Baden-Württemberg-Stipendium), Studienrichtung Life & Physical Science
2004 – 2006	Studium der Biologie (Hauptstudium und Diplomarbeit) an der Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg i. Br.

Dissertation:

01.08. 2007 – 31.12.2010	Experimentelle Arbeiten zur Dissertation unter Betreuung von Prof. Dr. F. Kempken in der Abteilung Botanische Genetik und Molekularbiologie des Botanischen Instituts der Christian-Albrechts-Universität Kiel
--------------------------	--

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit – abgesehen von der Beratung durch meine akademischen Lehrer – nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist. Es wurden keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet. Die wörtlich oder inhaltlich anderen Quellen entnommenen Stellen sind als solche gekennzeichnet.

Die Arbeit wurde bis jetzt weder ganz noch teilweise an anderer Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Ferner erkläre ich, dass ich noch keine früheren Promotionsversuche unternommen habe.

Für die mündliche Prüfung wird die Form der Disputation gewählt. Der Zulassung von Zuhörern/Zuhörerinnen bei der mündlichen Prüfung wird nicht widersprochen.

Kiel,

Claudia Willeke

Finanziert wurde diese Arbeit aus Mitteln des Innovationsfonds "Anoxie/Hypoxie induzierte Signaltransduktion in Pro- und Eukaryoten" des Landes Schleswig-Holstein.